

MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

Guía de Trabajo



VISIÓN

Ser la mejor organización de educación superior posible para unir personas e ideas que buscan hacer realidad sueños y aspiraciones de prosperidad en un entorno incierto

MISIÓN

Somos una organización de educación superior que conecta personas e ideas para impulsar la innovación y el bienestar integral a través de una cultura de pensamiento y acción emprendedora.



Presentación

La definición clásica de la Microbiología como “la ciencia que estudia a los microorganismos” es intelectualmente corta y puramente metodológica, y refleja claramente las limitaciones humanas para desentrañar la realidad natural.

Los microbios, esos diminutos seres imposibles de ver que sabemos que rodean nuestro ambiente pero que apenas conocemos algo sobre ellos.

Estos microorganismos mantienen una actividad y relación continua con el medio ambiente esencial para la vida en nuestro planeta. El estudio de la diversidad de microbios que existen en el mundo es un conocimiento relativamente nuevo para la humanidad y con mucho campo por estudiar y descubrir aún. De hecho, tan solo el 1% de los microbios que existen en la biosfera han sido reconocidos por los **microbiólogos** hasta nuestros días.

El manual de prácticas de laboratorio de Microbiología Ambiental elaborado para los estudiantes de Ingeniería Ambiental tiene como objetivo formar en la metodología de aislamiento e identificación de los principales grupos microbianos de mayor importancia en nuestro medio, en relación con el papel que cumplen en la naturaleza y en salud pública.

La elaboración del presente manual es producto del conocimiento y experiencia del autor en el área de microbiología. Las prácticas que este volumen contiene son: Bioseguridad en el laboratorio, Reconocimiento de Materiales y Equipos de Laboratorio, Coloraciones bacterianas, Medios de cultivo, Metabolismo bacteriano, Elaboración de la columna de Winogradsky, Cultivo de Hongos, etc.

El autor



Índice

VISIÓN	2
MISIÓN	2
PRESENTACIÓN	3
ÍNDICE	4
Primera unidad	
Bioseguridad en el laboratorio	5
Práctica N° 1: Reconocimiento de materiales y equipos de laboratorio	12
Práctica N° 2: Medios de cultivo	18
Práctica N° 3: Columna de Winogradsky	23
Práctica N° 4: Uso adecuado del microscopio	28
Segunda unidad	
Práctica N° 5: Coloraciones bacterianas	34
Práctica N° 6: Métodos de Siembra	39
Práctica N° 7: Lectura de colonias	43
Tercera unidad	
Práctica N° 8: Metabolismo microbiano	46
Práctica N° 9: Aislamiento de Rhizobium	54
Práctica N° 10: Aislamiento de hongos	57
Cuarta unidad	
Práctica N° 11: Técnicas para la enumeración de microorganismos: análisis microbiológico del agua.	63
Referencias bibliográficas	74



BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

1. Objetivos:

- Proteger al personal de laboratorio contra la exposición innecesaria e injustificada a agentes infecciosos.
- Salvaguardar la integridad de la muestra clínica contra la degradación o contaminación cruzada que pueda poner en peligro la validez de los hallazgos de laboratorio.
- Mantener los agentes infecciosos dentro de los confines del laboratorio.

2. Generalidades:

Durante el trabajo diario en el laboratorio, se dan situaciones de potenciales riesgos que varían según el agente infeccioso y los procedimientos utilizados. Las Normas de Bioseguridad pretenden reducir a un nivel aceptable el riesgo inherente a la manipulación de material peligroso.

El trabajo en el laboratorio de Biología es, como en la mayoría de las otras secciones del Laboratorio Clínico, un trabajo de grupo. La actitud ante las practicas seguras de cada uno de los integrantes del equipo, determinan su propia seguridad, así como la de sus compañeros y la de la colectividad del Laboratorio.

Por otra parte, el equipamiento y el diseño del laboratorio es parte fundamental en el esfuerzo de protección de los empleados en el ejercicio de sus labores. Las características especiales del trabajo en el laboratorio hacen imperante un Manual que sirva de guía a los profesionales de la salud en su trabajo diario. La formación es pues clave en la eficacia de los programas de seguridad y ésta debe ser facilitada a todas las personas que están expuestas a los riesgos del laboratorio.

Un programa de seguridad gestionado por profesionales bien entrenados, con un alto grado de participación por parte de los trabajadores, puede llevar no sólo a una disminución del número de lesiones y enfermedades, sino también a un incremento de la satisfacción del trabajador y de su productividad.

Bioseguridad: Es un conjunto de medidas preventivas de sentido común para proteger la salud y la seguridad del personal que trabaja en el laboratorio frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, por simplificar, se incluyen normas contra riesgos producidos por agentes físicos, químicos y mecánicos.

La seguridad se realiza en conjunto: tanto por el personal que debe cumplir con las normas de bioseguridad y por otro lado la administración que debe dar las facilidades para que estas normas sean cumplidas.



Medidas Generales:

Las siguientes medidas son de obligado cumplimiento en cualquier área del laboratorio:

- El acceso al laboratorio estará limitado al personal autorizado.
- Todas las áreas estarán debidamente marcadas con la señal de riesgo biológico y su nivel de contención.
- Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas para mantener la adecuada contención biológica.
- Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente y siempre que se produzca un derrame. Los residuos y muestras peligrosas que van a ser incinerados fuera del laboratorio deben ser transportados en contenedores cerrados, resistentes e impermeables siguiendo las normas específicas para cada tipo de residuo.
- El laboratorio debe permanecer limpio y ordenado y no es aconsejable utilizar los pasillos como almacén.
- El transporte de las muestras dentro o entre laboratorios se realizará en cajas herméticas o neveras transportables.
- La ropa protectora, fácilmente ajustable y confortable, así como guantes, gafas, etc. debe estar disponible en todo momento. La ropa protectora de las áreas con nivel de contención 3 (batas) nunca debe ser usada fuera del área de trabajo y si se quita debe de ser desechada automáticamente en una bolsa de material contaminado. Jamás debe volver a ser usada.
- Todo el personal debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Con este fin deben usarse guantes cuando se manipulen muestras o cultivos que contengan posibles patógenos. Los guantes siempre serán desechados antes de salir del área de trabajo. Jamás se saldrá de la misma con los guantes puestos, ni con ellos se cogerá el teléfono, se tocarán las hojas de examen, maniguetas de las puertas, etc.
- Tras quitarse los guantes, se realizará un lavado de manos.
- Se usarán gafas protectoras y mascarillas faciales si existe riesgo de salpicaduras y/o aerosoles.
- Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Supervisor y al Jefe del Laboratorio y hacerse constar por escrito.
- Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. Se realizará pipeteo automático con material adecuado y cada trabajador será instruido para manejarlo debidamente.
- En la zona de trabajo no debe colocarse material de escritorio ni libros ya que el papel contaminado es de muy difícil esterilización.
- El personal debe lavarse las manos frecuentemente durante las actividades rutinarias, tras acabar la jornada laboral y siempre antes de abandonar el laboratorio (almorzar). Se usará un jabón antiséptico y el secado se realizará con papel.
- Las heridas y cortes en las manos, si se han producido en el Laboratorio, serán comunicados al responsable de la sección correspondiente, así como al Supervisor de Bioseguridad que lo



registrará haciendo constar todas las circunstancias. Las heridas y cortes deben ser convenientemente vendados y después es imprescindible ponerse guantes.

- Los productos inflamables (gases, alcohol, éter, etc.) deben mantenerse alejados de las llamas de los mecheros. Si hay que calentar tubos de ensayo con estos productos, se hará al baño María, nunca directamente a la llama. Si se manejan mecheros de gas se debe tener mucho cuidado de cerrar las llaves de paso al apagar la llama.
- Cuando se manejan productos corrosivos (ácidos, álcalis, etc.) deberá hacerse con cuidado para evitar que salpiquen el cuerpo o los vestidos. Nunca se verterán bruscamente en los tubos de ensayo, sino que se dejarán resbalar suavemente por su pared.
- Antes de utilizar un compuesto hay que fijarse en la etiqueta para asegurarse de que es el que se necesita y de los posibles riesgos de su manipulación

Agentes de riesgos:

El personal de laboratorio diariamente realiza muchas actividades que pueden causar enfermedad o daño en el o en las personas que trabajan en ambientes cercanos e incluso en sus familiares y a la comunidad.

Estas enfermedades pueden ser causadas por:

- Agentes Biológicos: virus, bacterias, hongos y parásitos.
- Agentes Físicos y Mecánicos: temperaturas extremas, radiaciones ionizantes, contactos eléctricos o conexiones defectuosas, vidrios resquebrajados de recipientes dañados o tubos rotos.
- Agentes Químicos: sustancias corrosivas, que pueden causar destrucción o alteración a los tejidos, tóxicos cuyos efectos se manifiestan según la vía de exposición, carcinogénicos, inflamables o explosivos.

Clasificación de los agentes biológicos por grupo de riesgo

- **Agente biológico del grupo 1:** Se refiere a aquél que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre. Ejemplos: *B. Subtilis*, *Naegleria*, *E. coli K 12*, *Saccharomyces sp.*
- **Agente biológico del grupo 2:** Es aquél que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz. Ejemplos: *Actinomyces sp*, *Bacteroides sp*, *Enterobacterias*, *Shigella sp*, *Candida sp*, *Cryptococcus neoformans*.
- **Agente biológico del grupo 3:** Aquél que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo frente a él generalmente profilaxis o tratamiento eficaz. Ejemplos : *Mycobacterium tuberculosis y bovis*, *Histoplasma capsulatum*, *Neisseria meningitidis* , *Coccidioides immitis*, *Chlamydia trachomatis*.



- **Agente biológico del grupo 4:** Se refiere a aquél que causando una enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista generalmente frente a él profilaxis o tratamiento eficaz. Ejemplos: Virus de Lassa y Ébola.

Las cabinas de seguridad

Son cámaras de circulación forzada que, según sus especificaciones y diseño, proporcionan diferentes niveles de protección. Son fundamentales en un Laboratorio de Microbiología y se clasifican según el nivel y tipo de protección. Una Cabina de Seguridad Biológica es una barrera primaria cuando se trabaja con agentes peligrosos o infecciosos, sin embargo, ellas no proveen un completo aislamiento, por ejemplo en el control de aerosoles. Es necesario incrementar las prácticas de seguridad cuando se trabaja con una de éstas cabinas.

1. La **campana de gases** es un recinto ventilado que captura los humos y vapores procedentes de la manipulación de los productos químicos en el laboratorio. Si bien constituye un equipo muy útil en la contención del riesgo químico, no ofrece protección alguna frente a riesgos biológicos.
2. Las **cabinas de flujo laminar** son recintos que emplean un ventilador para forzar el paso del aire a través de un filtro HEPA barriendo la superficie de trabajo. El flujo de aire puede ser vertical u horizontal. Estas cabinas ofrecen protección únicamente al material que se maneja en su interior, pero nunca al operador.
3. Las **cabinas de seguridad biológica (CSB)** son recintos ventilados diseñados para limitar al máximo el riesgo del personal de laboratorio expuesto a agentes infecciosos. Ello es especialmente importante si se tiene en cuenta que muchas de las operaciones realizadas en un laboratorio implican la formación de aerosoles. Estos equipos tienen como objetivo principal proporcionar una zona de trabajo que minimice la probabilidad que una partícula transportada por el aire tiene de escapar hacia el exterior de la cabina y contaminar así al operario y a la zona que le rodea. Además, algunas de ellas, ofrecen protección al material que se manipula. Cuando una CSB es utilizada por personal debidamente formado y consciente de las limitaciones de ésta, se convierte en un equipo de contención muy efectivo para reducir el posible escape de contaminación biológica.



BIOSEGURIDAD

Figura 1: Símbolo de bioseguridad para instalaciones biomédicas

Se admite solo al personal autorizado

Identificación de Seguridad:

Investigador Responsable:

En caso de Emergencia llamar:

Teléfono Diario:Teléfono de Casa:

Para el ingreso debe obtener una autorización del investigador responsable cuyo nombre se menciona arriba.

TRABAJO:

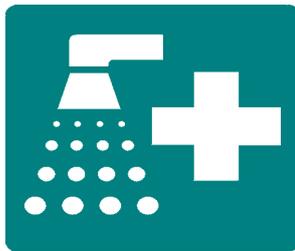
1. Por grupo de laboratorio grafique 15 símbolos de bioseguridad en hojas A4.



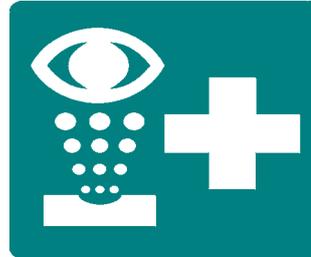
Símbolos de Bioseguridad

SEÑALES DE SALVAMENTO

Ducha de emergencia



Dispositivo para lavado de ojos



Portar guantes protectores



Portar protección de ojos



SEÑALES DE PROHIBICIÓN

Prohibido el fuego, luz abierta y fumar



Prohibido de extinguir fuegos con agua





Fig. 2 Pictogramas de Bioseguridad

Productos inflamables



Productos corrosivos



Productos tóxicos



Productos explosivos



Campo electromagnético



Atmosfera explosionable



Productos radioactivos o radiaciones ionizantes



Riesgo biológico



Leer y anotar los resultados.



Reconocimiento de materiales y equipos de laboratorio

1. OBJETIVOS:

- Informar correctamente los materiales y equipos que se utilizan en el laboratorio
- Conocer la importancia del uso adecuado de materiales y equipos de laboratorio en la investigación.

2. GENERALIDADES:

En el laboratorio es necesario conocer los diferentes materiales y equipos que se utilizan en las diversas actividades ya sea en investigación o docencia, para tal fin es importante saber la función de cada uno de ellos para poder trabajar correctamente.

Los materiales en los que se miden y se combinan sustancias están fabricados con vidrio a base de Silicatos (vidrio óptico, vidrio de Jena o vidrio duro). Éstos, debido a su composición, son muy resistentes a la acción de los reactivos químicos y/o los cambios bruscos de temperatura. **Estos** materiales para medir volúmenes que pueden ser de vidrio o de plástico transparente deben estar graduados. Ejemplos: Probeta, Pipeta, Bureta, Matraz aforado. **Saber manejar los equipos de Laboratorio** es también una prioridad ya que muchos de ellos funcionan a corriente eléctrica y el uso correcto de estos equipos podría evitar accidentes.

2.1. MATERIALES DE VIDRIO.

- **Beacker (Vaso de precipitado).**- Son de vidrio y los hay de diferentes tamaños, están graduados y tienen pico, pueden ser también de plástico. Útiles para hacer mezclas o soluciones, preparar colorantes, realizar evaporaciones o para que contengan líquidos.
- **Asa de siembra.**- Con mango aislante o con alambre; son útiles para el sembrado de hongos y de bacterias en diversos cultivos.
- **Balón de destilación.**- Instrumento de vidrio que se usa para calentar líquidos, cuyos vapores deben seguir un camino obligado (hacia el refrigerante), por lo cual cuentan con una salida lateral.
- **Placas de Petri.**- Existen de diferentes medidas; es utilizada para preparar cultivos de hongos y bacterias, y también para seleccionar muestras de animales sirve para observar microorganismos en el laboratorio.
- **Cubre objetos.**- Sirven para preparar soluciones o bien para colocar sobre ellos muestras de animales o plantas que serán observados al microscopio.
- **Frasco Gotero:** Son de color blanco o ámbar. Sirven para guardar de una manera segura los reactivos, regularmente se administra con conteo de gotas.



- **Matraces aforados (fiola).**- Son matraces de fondo plano y cuello estrecho muy alargado, donde tienen una marca de tal modo que, cuando están llenos hasta dicha marca, se indica el volumen que contienen, que pueden ser de 50, 100, mL etc.,. Son usados para preparar varias soluciones tipo y para diluciones a un volumen determinado.
- **Matraz Erlenmeyer.**- Hecho de vidrio, tiene forma de cono con fondo plano; pueden estar graduadas o no y se encuentran en diversos tamaños. Es empleado para calentar líquidos, preparar soluciones o para cultivo durante los experimentos.
- **Pipeta serológica.**- Material de vidrio que se utiliza para medir volúmenes de 1, 5, 10 ml.
- **Porta objetos.**- Pueden ser laminillas de cristal con ligeras hendiduras, o sin ellas, en donde son depositadas las sustancias que posteriormente se observarán al microscopio.
- **Probeta graduada.**- Las probetas son instrumentos para medir volúmenes y su uso es muy frecuente . Es un tubo de cristal con pié, se usan para medir los líquidos o sustancias en centímetros cúbicos. La base de la probeta es amplia y el extremo opuesto generalmente tiene un "pico" para facilitar verter los líquidos que se miden.
- **Tubo de ensayo (Tubo de prueba).**- Sirven para contener diversas sustancias en pequeños volúmenes; para preparar cultivos de bacterias y hongos; para realizar diferentes experimentos y pueden ser de diferentes medidas.
- **Vagueta (Varilla de Cristal).**- Consiste en una varilla de vidrio, que se utiliza para mezclar o disolver las sustancias, pueden ser de diferentes diámetros y longitud. Pueden prepararse agitadores de diferentes tamaños de 6 o más milímetros de diámetro para evitar que se rompan fácilmente.



Probeta



Beacker



Matraz de Erlenmeyer



Placas petri

Figura 2.



2.2. Materiales diversos:

- **Broche de madera (pinzas de madera).**- Se utiliza para sujetar tubos de ensayo.
- **Cápsula de Porcelana (mortero).**- Es de forma semiesférica, se utiliza para moler sustancias o bien para combinar o mezclar diferentes sustancias durante el experimento.
- **Espátula.**- Pueden ser de acero o de porcelana. En el laboratorio se manejan a veces sustancias químicas sólidas con las que es preciso manipular: sacar una pequeña porción de un recipiente y depositarla en aparatos de medición u otro, mezclar cantidades reducidas de diversas sustancias guardadas en sus frascos correspondientes.
- **Gradilla.**- Apoyar tubos de ensayo.
- **Mechero de alcohol.**- Puede ser cualquier recipiente que contenga alcohol, mecha, el tapón de rosca agujerado donde sobresalga la mecha y un tapón para cubrir la mecha una vez que se ha utilizado.
- **Mechero de Bunsen.**- Es un aparato que consta de un tubo vertical soportado en un pie o pequeña plataforma a la que va enroscado. El tubo en su base tiene un pequeño orificio vertical para permitir la entrada de gas y arriba de esa entrada de aire, rodeadas de un anillo móvil que sirve para regular la cantidad de aire, pueden alcanzar temperaturas hasta 2000 °C.
- **Pinzas o Tenazas.**- Las pinzas o tenazas están hechas de fierro, con ellas podemos tomar recipientes calientes;
- **Soporte Universal.**- Consiste en una varilla con una base de fierro de forma rectangular, o con una base en forma de triángulo. Es útil para colocar y fijar en ellos a los anillos o las pinzas de bureta, en donde serán puestos los recipientes que se calentarán durante la práctica de laboratorio.
- **Tela metálica con asbesto.**- Es una tela de alambre con centro de asbesto. Sirve para depositar sobre ella los matraces en el momento en que se van a calentar las sustancias; permite que la distribución del calor sea uniforme.
- **Trípode.**- Puede ser fijo o desmontable. Sirve para depositar sobre él matraces y diversos utensilios para su observación o bien, para colocar los matraces al fuego y aumentar la temperatura de las sustancias.



MATERIAL BÁSICO DE LABORATORIO



Figura 3. Materiales de uso frecuente en un laboratorio de Microbiología.



2.3. Equipos de laboratorio

- **Refrigeradora.**-Se utiliza para almacenar reactivos y **muestras** biológicas.
- **Estufa eléctrica.**- Equipo muy util en el laboratorio. Sirve para secado de sustancias y esterilización. Alcanza temperaturas ente 250 y 300 °C.
- **Micrótopmo.**- Se usa para hacer los cortes de tejidos vegetales o animales con medidas de micra de grueso.
- **Incubadora.**- En este equipo se guardan cultivos de microorganismos para su óptimo desarrollo.
- **Baño María.**- sirve para mantener temperaturas homogéneas.



Figura 4. Baño María

- **Balanza.**- Instrumento muy importante en el laboratorio. Las dos condiciones indispensables de una balanza son: exactitud y sensibilidad. La balanza debe colocarse sobre un soporte bien fijo, protegido de vibraciones mecánicas.
- **Centrífuga.**- Equipo que permitirá al usuario separar sustancias a diferentes velocidades



Figura 5. Balanza analítica

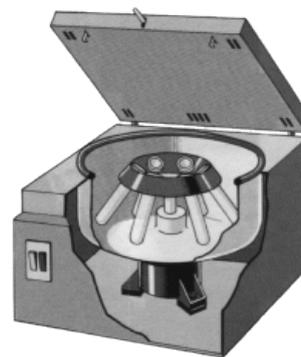


Figura 6. Centrífuga



Señale el nombre de los siguientes equipos:



.....
.....



.....
.....



.....
.....



.....



.....



PRÁCTICA # 2

Medios de cultivo

1. Objetivo:

- Reconocer los principales medios de cultivo utilizados en microbiología.
- Analizar la composición de los medios de cultivo.

2. Generalidades:

Para el aislamiento de bacterias de un material patológico, es necesario su cultivo en medios especiales denominados medios de cultivo.

Los medios de cultivo son una mezcla equilibrada de nutrientes que en concentraciones adecuadas y con condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos. Contienen una base mineral; fuente de carbono, nitrógeno y azufre; atmósfera adecuada y los factores de crecimiento necesarios.

Según su estado físico los medios de cultivos se clasifican en:

- Medios líquidos.
- Medios Semisólidos.
- Medios sólidos.

Según su composición pueden ser: simples, enriquecidos, selectivos y diferenciales.

- **Medio simple:** son los medios que presentan la mínima cantidad de nutrientes capaz de permitir el desarrollo de los microorganismos.
- **Medio enriquecido:** medio que tiene un gran exceso de nutrientes y se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales. Agar chocolate, agar cerebro-corazón, etc.
- **Medio selectivo:** medio que sólo permite el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibe el de otros. Permite seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos *Staphylococcus*), TCBS (Tio Sulfato Bilis Sacarosa).
- **Medio diferencial:** medio que permite revelar características fisiológicas de los microorganismos. TSI (Tres Azucares y Fierro), LIA (Agar Lisina Fierro).

Además, existen Medios de Enriquecimiento, que es una técnica que permite el desarrollo de un grupo de microorganismos a partir de una muestra que contiene una gran variedad de microorganismos. Se utiliza un medio selectivo líquido para favorecer la competencia entre los organismos y se incuba bajo determinadas condiciones. Aquellos microorganismos para los que el ambiente sea más favorable crecerán más que los otros y finalmente serán predominantes.



Caldo nutritivo

- Extracto de carne 0.3 g
- Peptona 1.0 g
- Dextrosa 0.5 g
- Cloruro de sodio 0.5 g
- Agua destilada 100 ml
- pH 7.0 - 7.4

Caldo peptonado

- Peptona 2.0 g
- Cloruro de sodio 1.0 g

Agar simple

- Extracto de carne 0.3 g
- Peptona 1.0 g
- Dextrosa 0.5 g
- Cloruro de sodio 0.5 g
- Agua destilada 100 ml
- Agar 1.5 g
- pH 7.0 - 7.4

3. Materiales

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza	De precisión de 3 ejes	1
2			

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Probetas	100 ml	1
2	Balones	250 ml	1
3	Tiras de Papel indicador de pH		1
4	Pinzas rectas		1
5	Trípodes con malla de Asbesto		1
6	Tubos de ensayo	16x150 mm	1
7	Tubos de ensayo	13x100 mm	1
8	varilla de vidrio		1
9	Placas Petri	15 x 100 mm	1
10	Fascos estériles		1
11	Agua destilada		1



3.3. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Frasco con solución NaOH (N/10)		1
2	Frasco con solución HCl (N/10)		1

3.4. Medios de cultivo

Item	Medios de cultivo	Característica	Cantidad
1	Agar Mac Conkey		1
2	Agar SS.		1
3	Agar TSI		1
4	Agar Citrato de Simmons		1
5	Agar Urea.		1
6	Caldo MR VP		1
7	Agar Lisina Hierro.		1
8	Tubo con sangre citratada		1

4. Procedimiento:

4.1 Medios de cultivo simples:

- Para el **Caldo nutritivo**; primero disolver los ingredientes en los 100 ml de agua destilada y someter al calor hasta su completa dilución. Luego tomar el pH con el papel indicador. Si el medio es ácido agregar gota a gota la solución de NaOH; si el medio es alcalino agregar gota a gota solución de HCl hasta lograr el pH indicado. Envasar y esterilizar a la autoclave a 121 °C por 15 Minutos. Controlar la esterilidad incubando a 37 °C por 24 horas. Luego dejar en refrigeración hasta su utilización.
- Para el **Agar simple**; disolver primero el Agar en los 100 ml de agua destilada tibia, luego agregar los demás ingredientes. Controlar el pH con ayuda de las soluciones de NaOH ó HCl. Luego envasar y esterilizar a 121°C por 15 Minutos y controlar la esterilidad por incubación a 37°C por 24 horas. Dejar luego en refrigeración hasta su utilización.

4.2. Medios enriquecidos:

- Para el **Agar Sangre**; primero preparar Agar simple y esterilizar en autoclave, luego dejar enfriar hasta una temperatura de 45 °C y adicionar 5ml de sangre nitratada o desfibrilada. Mezclar con movimientos rotatorios hasta obtener un buen homogenizado y distribuir en Placas Petri estériles; dejar luego solidificar y realizar el control de esterilidad. Mantenerlo en refrigeración hasta su utilización. El color normal del medio debe ser rojo cereza.
- Para el **Agar chocolate**; preparar primero Agar sangre y someterlo a una temperatura de 80 °C hasta que se torne color chocolate, luego repartir en placas Petri estériles y realizar control de esterilidad y dejarlo después en refrigeración.



I. **Medios selectivos:**

1. Para el **Agar SS**; disolver el medio deshidratado en 100 ml. de Agua destilada, someter al calor hasta su completa disolución. Repartir luego en placas estériles. No necesita autoclavar.
2. Para el **Agar Mac Conkey**; disolver el medio en los 100 ml de Agua destilada, calentar hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 Minutos y repartir en placas estériles.

II. **Medios diferenciales:**

1. Para el **Agar TSI** (Hierro tres azúcares); disolver el medio en 100 ml de Agua destilada, hervir hasta su completa disolución. Distribuir en tubos de 13x100mm y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 Minutos. Luego colocar los tubos en plano inclinado. El medio al final tendrá un color rojo naranja.
2. Para el **Agar Citrato Simmons**, seguir los pasos para el Agar TSI, el medio tendrá un color verde.
3. Para el **Agar Urea**; disolver el medio en agua destilada, hervir hasta su completa disolución y esterilizar en autoclave. Después adicionar 5 ml de Solución de Urea al 40% esterilizada por filtración; mezclar homogéneamente y repartir en tubos de 13x100mm en plano inclinado. El medio tendrá un color amarillo.
4. Para el **Caldo Peptonado**; disolver los medios en agua destilada tibia, repartir en tubos de 13x100mm y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 Min.
5. **Agar Lisina Hierro**; disolver el medio en agua destilada por calor hasta su completa disolución y repartir en tubos de 13x100mm; luego esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min., y dejar enfriar los tubos en plano inclinado.

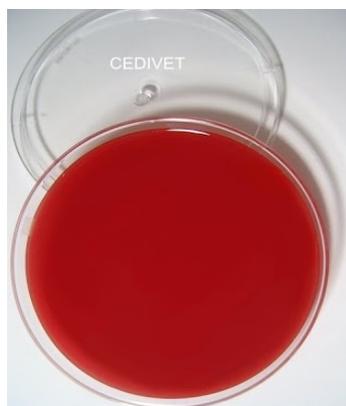


Figura 7. A la derecha se observa el Agar Sangre y a la izquierda el Agar Mc Conkey



INDICADOR	Acido	Alcalino	Intervalo de pH de viraje
Azul de Timol	rojo	amarillo	1'2 - 2'8
Azul de bromofenol	amarillo	azul	3'0 - 4'6
Azul de bromotimol	amarillo	azul	6'0 - 7'6
Azul de Timol (2ª etapa)	amarillo	púrpura	8'0 - 9'6
Naranja de metilo	rojo	amarillo	3'1 - 4'4
Rojo de metilo	rojo	amarillo	4'2 - 6'3
Fenolftaleína	incoloro	rojo	8'3 - 10'0
Tornasol	rojo	azul	6'1 - 7'2

Figura 8. Indicadores de pH utilizados en los diferentes medios de cultivo



PRÁCTICA # 3

Columna de Winogradsky

1. Objetivo:

- Observar la distribución de las poblaciones microbianas en la columna de Winogradsky.
- Explicar cómo se desarrollan las diferentes poblaciones heterótrofas y fotoautótrofas.

2. Fundamento Teórico

La columna de Winogradski es un dispositivo simple que permite el cultivo de una gran diversidad de microorganismos y que, como su nombre indica, fue un invento de Serguéi Winogradski.

El aparato consiste en una columna llena de agua y fango. Incubando esta columna bajo luz solar durante meses, se forma un gradiente de oxígeno y otro de sulfuros, que determinan una amplia variedad de ambientes en las que se disponen diferentes especies de microorganismos.

La columna de Winogradsky es una demostración clásica de cómo los microorganismos ocupan "microespacios" altamente específicos de acuerdo con sus tolerancias medio ambientales y sus necesidades vitales (requerimientos de carbono y energía).

Por otro lado, la columna de Winogradsky puede ser utilizada para establecer cultivos de enriquecimiento de diferentes tipos microbianos. Por ejemplo, para el caso de bacterias fotosintéticas al menos cuatro grupos pueden ser encontrados: cianobacterias (antes conocidas como azul-verdosas), verdes sulfurosas, púrpuras sulfurosas y púrpuras no sulfurosas.

Finalmente, las columnas pueden adaptarse a la exposición de diferentes factores y de esta manera investigar cómo los diferentes tipos de luz, pH, temperatura, etc., afectan sobre la composición del ecosistema que se desarrolla en este microambiente.

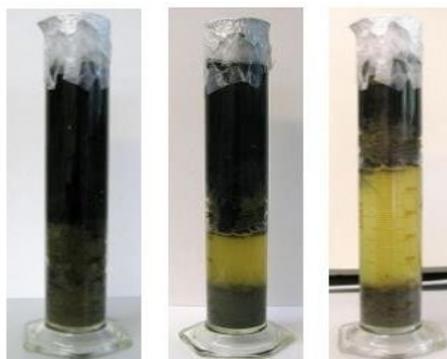


Figura 9. Columna de Winogradsky después de un mes (izquierda), dos meses (centro) y tres meses



3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza	De precisión de 3 ejes	1
2	Calibrador pie de rey (Vernier)	Lectura digital	1
3			

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	botellas de plástico	2 L	2
2	bolsa negra		1
3	Papel aluminio		1
4	Papel periódico finamente cortado		1
5	huevo cocido (yema de huevo)		1
6	Restos de raíces de plantas, aserrín, fruta descompuesta		1
7	Sedimento y agua de un ambiente natural-laguna de paca	50 g	1
8	varilla de vidrio		1
9	Tijera		1
10	Cinta adhesiva		1
11	hilo nylon	2 m	1
12	laminas		2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	CaCO ₃ o cascara pulverizada de huevo	4 g	1
2	CaSO ₄ o yeso	4 g	1
3	NaHCO ₃	2 g	1
4	NH ₄ Cl	2 g	1
5	Solución Tampón fosfato pH 7,3	2 ml	1

4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.3 Tener cuidado cuando se trabaja con NH₄Cl ya que es reactivo cancerígeno.



5. Procedimientos:

Primero: Recolección de la muestra

1. **Recolectar** 500 g Muestra de lodo de un estanque, lago o pantano, costa de mar o río rica en materia orgánica (sedimento superficial o subsuperficial).
2. Recolectar 1 L de agua de estanque, lago o pantano, costa de mar o río de donde se sacó la misma muestra de lodo.

Segundo: Preparación de la columna

1. Se usa 2 columnas grandes de cristal (una probeta de 100 ml) o de plástico transparente (botella de 2 L).
2. Recolectar una cantidad de barro o lodo, retirar las piedras y restos de tamaño grande de este lodo.
3. Se añaden restos orgánicos de diferente origen como: tiras de papel de periódico, aserrín, restos de raíces de plantas y carne picada, etc como **Fuente de carbono**. Es importante que la celulosa permanezca en el fondo o en la zona intermedia, pero no en la zona superficial, ya que las bacterias que degradan la celulosa son anaeróbicas. Deben evitarse los sustratos fácilmente fermentables, que pueden producir una formación excesiva de gas.
4. Llenar la columna con lodo hasta 1/3 de su volumen total.
5. Se añade las sales:
Fuente de sulfato: 1 g sulfato de calcio, (CaSO_4)
Agente tamponador de pH: 1 g de carbonato cálcico (CaCO_3)
6. El lodo también puede mezclarse con el contenido de la yema de huevo desmenuzada que sirve como **fuentes de azufre**. Se añade también 1g bicarbonato sódico (NaHCO_3), y 1ml tampón fosfato pH 7,3.
7. Compactar esta mezcla (lodo + sales + restos orgánicos) con la ayuda de una espátula a fin de eliminar las burbujas de aire. Obtener una capa de 10 cm aproximadamente.
8. Añadir el agua procedente del estanque a la mezcla hasta una altura cercana al borde del recipiente (3 a 5 cm por debajo del borde). La mezcla se debe adicionar lentamente para no resuspender la muestra. (El recipiente debe estar ligeramente inclinado y luego adicionar lentamente la mezcla para evitar la formación de burbujas). Esperar 30 minutos. La capa de agua en la parte superior deberá medir por lo menos dos cm de altura. Agregar agua, si fuera necesario. Considere que la proporción de las capas inferior de lodo y superior de agua pueden variar.
9. Con la varilla de vidrio eliminar las burbujas de aire generadas.
10. Cubrir la boca de la columna con papel aluminio o parafina para evitar tanto el depósito de polvo como la evaporación de agua.
11. Registrar y dibujar la imagen final de la columna (color del sedimento y del



líquido).

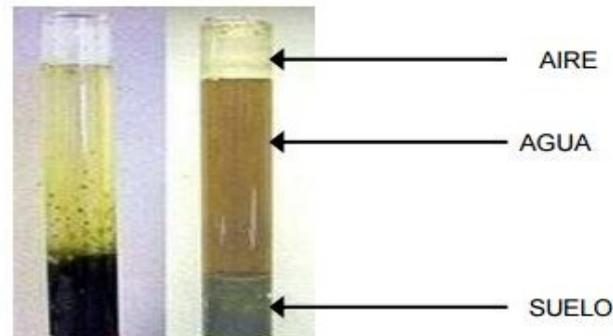


Figura 10. Columna de Winogradsky después de un mes (izquierda), dos meses (centro) y tres meses (derecha). La estratificación se hace cada vez más evidente

12. Tomar 2 portaobjetos y hacerles unas muescas (Fig. 2A). Sobre ellas amarrar un extremo del hilo cáñamo de tal forma que se pueda jalar el portaobjetos con el otro extremo (figura 2B).
13. Colocarlos 2 portaobjetos en una posición vertical a diferentes niveles, uno sobre el sustrato inclinados contra la pared del recipiente dejando que el extremo de hilo suelto quede suspendido fuera de la botella y uno en los primeros 10 cm de la superficie. (Fig. 2C).

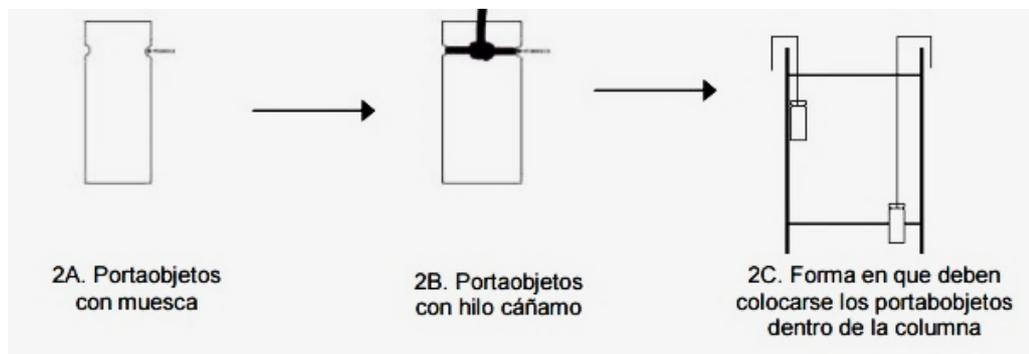


Figura 11. Secuencia de pasos para colocar los portaobjetos con muestra en la columna de Winogradsky

14. Incubar a temperatura ambiente cerca de una ventana para que reciba luz solar o de lo contrario usar luz artificial.
15. Se examinará la columna periódicamente, anotando los cambios de color y grosor de las diferentes capas. Registre los cambios macroscópicos observados. Se tomarán muestras de las capas para estudiar los diferentes tipos de microorganismos al final del experimento (11 y 12 de junio del 2016).



16. En caso se evapore el agua, mantenga su volumen agregando agua destilada.
17. Para el estudio de las bacterias de la columna de Winogradsky, se puede introducir una pipeta larga para recoger una pequeña muestra de lodo o agua, que puede ser usada en microscopía con aumentos de 10 y 40 de aumento, para el caso de bacterias se utilizaran en aumento de 100.
18. Una columna se usa como muestra problema y otra columna como muestra control (sin luz y cubierta con bolsa negra)

Tercero

19. Dejar incubar por 3 meses y anotar los resultados observados en la columna.

6. Resultados

Se examinará la columna periódicamente, anotando los cambios de color y presencia de las diferentes capas o franjas.

Reporte de observaciones para la columna de Winogradsky – Columna Problema



PRÁCTICA # 4

Uso adecuado del microscopio

1. Objetivos:

- Identificar cada una de las partes de un microscopio.
- Familiarizar al alumno con el manejo del microscopio compuesto.

2. Generalidades:

El microscopio es sin duda el elemento más importante para el estudio de la morfología celular. De los cuidados y correcto uso dependerá el éxito de las observaciones. El **microscopio** es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista. El tipo más común y el primero que se inventó es el microscopio óptico. Se trata de un instrumento óptico que contiene una o varias lentes que permiten obtener una imagen aumentada del objeto y que funciona por refracción

El primer microscopio fue inventado por Anthony van Leeuwenhoek (mediados del siglo XVII) y sólo lograba aumentar el tamaño de los organismos de 50 a 300 veces, y la iluminación era proporcionada por la luz solar. Leeuwenhoek describió por primera vez protozoos, bacterias, espermatozoides y glóbulos rojos.

En 1665 Robert Hooke observó con un microscopio células muertas de corcho. Unos años más tarde, Malpighi, anatomista y biólogo italiano, observó células vivas.

Durante el siglo XVIII el microscopio tuvo diversos adelantos mecánicos que aumentaron su estabilidad y su facilidad de uso. Las mejoras más importantes de la óptica surgieron en 1877 cuando Abbe publica su teoría del microscopio y, por encargo de Carl Zeiss, mejora la microscopía de inmersión sustituyendo el agua por aceite de cedro, lo que permite obtener aumentos de 2000.

Las fuentes de luz que se emplean para este tipo de microscopios son diversas y de ahí surge una gran variedad de tipos de microscopios ópticos: de campo claro, de contraste de fases, de fluorescencia, de luz ultravioleta, de luz polarizada.

El microscopio electrónico de transmisión (T.E.M.) fue el primer tipo de microscopio electrónico desarrollado. Utiliza un haz de electrones en lugar de luz para enfocar la muestra consiguiendo aumentos de 100.000 X. Fue desarrollada por Max Knoll y Ernst Ruska en Alemania en 1931. Posteriormente, en 1942 se desarrolla el microscopio electrónico de barrido (SEM).



Poder de Resolución: Es la capacidad de un sistema óptico para diferenciar entre dos puntos o líneas muy próximos.

$$PR = \frac{\lambda K}{n \text{ Sen } \mu}$$

$K = 0,5 - 0,8$

n = índice de refracción del medio

λ = Longitud de onda

Apertura numérica (A.N.): El producto, $n \text{ sen } \mu$, que aparece en la expresión del poder resolutivo, se llama apertura numérica (A.N.) de un objetivo y constituye una de las características más importantes de la lente. Los fabricantes marcan el número de la apertura numérica en la montura del objetivo junto con el aumento.

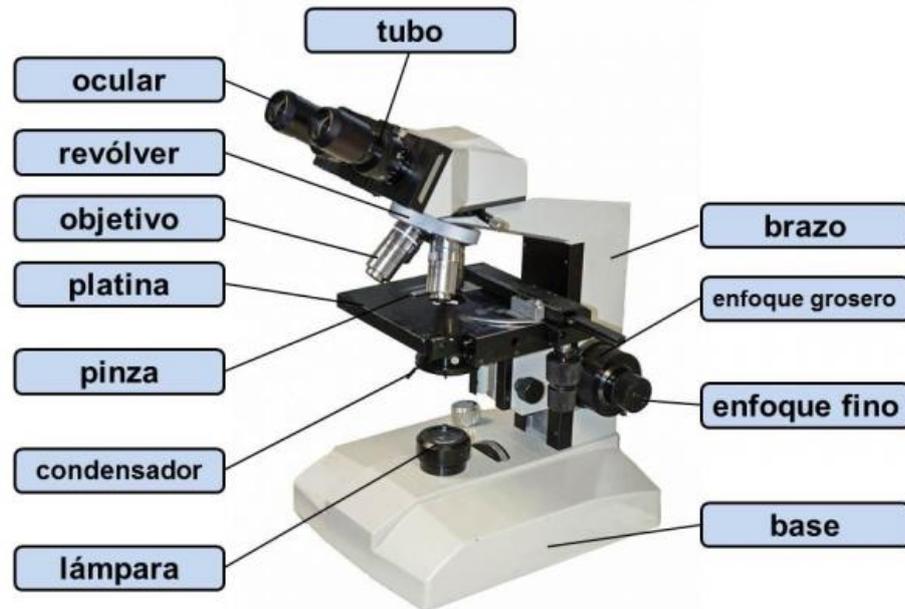
Partes de un microscopio óptico

Sistema óptico

- OCULAR: Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.
- OBJETIVO: Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.
- CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.
- DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.
- FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

- SOPORTE: Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.
- PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.
- CABEZAL: Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular.
- REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.
- TORNILLO MACROMETRICO: que aproxima el enfoque
- TORNILLO MICROMETRICO: que consigue el enfoque correcto.



<http://light-microscope.net>

Figura 12. De muestra un Microscopio compuesto y abajo los diferentes tipos de objetivos que se utilizan en la observación de muestras

Manejo del microscopio óptico

1. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
2. Comenzar la observación con el objetivo de 4x o colocar el de 10 aumentos (10x) para obtener una vista panorámica de la muestra.
3. Para realizar el enfoque:
 - a. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
 - b. Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
4. Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir desde el paso 3.
5. Empleo del objetivo de inmersión:
 - a. Bajar totalmente la platina.
 - b. Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar.



- c. Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
- d. Mirando directamente al objetivo de 100X, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.
- e. Enfocar cuidadosamente con el micrométrico
- f. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.
- g. Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- h. Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando papel lente para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN: (MET)

Reemplaza la luz visible por un haz de electrones que produce un muy alto poder de resolución. En este sistema se reemplazan los lentes (cristales) por campos electromagnéticos, estos producen la amplificación de la imagen. Este haz de electrones viaja en un tubo de alto vacío, la imagen formada es registrada en la pantalla (monitor) o en una placa fotográfica. La formación de la imagen depende de la dispersión de los electrones. Los cortes son de $1/40 \mu$ (250 A) de espesor. Se pueden obtener aumentos de hasta 160.000 veces.

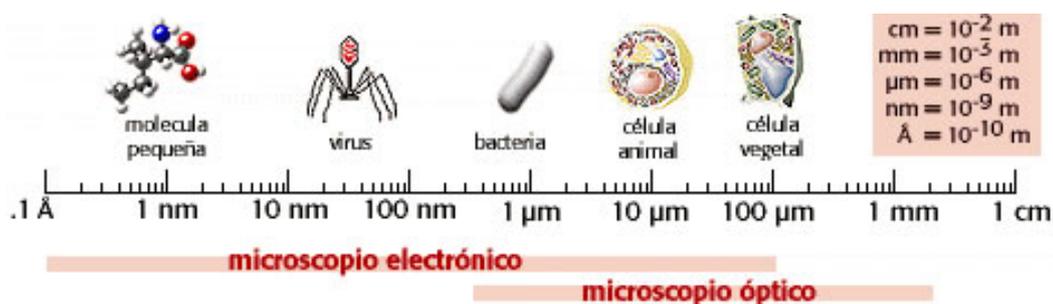


Figura 13. Tamaño relativo de las células y sus componentes

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO: (MEB)

A diferencia de los microscopios ópticos, el MEB utiliza un haz de electrones que se trasladan en una trayectoria libre de colisiones (columna de alto vacío) e interactúan con el espécimen, recorriendo la topografía de la muestra. El bombardeo de la muestra con el haz produce un elevado número de señales, las que son captadas por un detector y transformadas en una imagen.



Para la observación en alto vacío el material debe cumplir con dos requisitos: estar seco y ser conductivo. Los pasos a seguir para acondicionarlas son los siguientes:

Fijación: Se realiza a fin de detener los procesos fisiológicos del material y conservarlos lo más parecido posible al estado vivo. Se usa una mezcla de solventes como el FAA (formol, alcohol y ác. Acético).

Deshidratación: El agua presente en las muestras y/o en los fijadores al evaporarse, produce contaminación de la columna del MEB y deformación de la superficie de la muestra. Por ello los especímenes deben deshidratarse y secarse para su observación. La deshidratación se realiza por tratamiento del material en una serie acetónica ascendente. El secado se lleva a cabo por el proceso de punto crítico, que consiste en reemplazar la acetona por CO₂ líquido, el cual pasa a la fase gaseosa sin generar calor de evaporación. De este modo las muestras se secan sin colapsarse, ya que no están sujetas a los daños causados por la tensión superficial.

Metalización: Los especímenes a observar se recubren con una delgada capa de material conductivo (Au, Au/Pd, C), a fin de evitar los fenómenos de carga y daño por barrido de electrones a la muestra. El procedimiento para lograr este recubrimiento es la evaporación del metal en atmósfera de plasma de Argón.



Figura 14. Microscopio Electrónico



3. Materiales:

3.1. equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio compuesto		1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Láminas porta objetos		1
2	Láminas cubre objetos		1
3	Goteros		1
4	Letras en papel		1
5	Papel lente		1

3.3. Reactivos.

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Xilol		1
2			

4. Procedimiento:

1. Coloque cuidadosamente en su lámina portaobjeto un pedacito de papel en la cual este escrita una letra A, luego agregue una gota de agua y póngale el portaobjeto.
2. Observe al microscopio y anote sus observaciones.
3. Repita los mismos pasos para observar agua estancada.

Preguntas de repaso

1. ¿Qué diferencia existe entre aumento y poder de resolución?
2. ¿qué papel juegan el diafragma y el condensador en la iluminación?
3. ¿Cómo varia la iluminación al desplazar el condensador?
4. Calcular el poder de resolución del aceite de inmersión, sabiendo que $n= 1,4$, $k=0,65$, $\lambda=0,55$.



PRÁCTICA # 5

Coloraciones bacterianas

1. Objetivo:

- Observar en el microscopio las bacterias presentes en la mucosa labial.
- Identificar mediante coloraciones las diversas formas que tiene las bacterias.

2. Generalidades:

Las bacterias organismos procariontes unicelulares, carecen de envoltura nuclear, en algunas circunstancias forman esporas para protegerse del medio. Presentan formas diversas: bacilos, cocos, espirilos, estreptococos, estafilococos etc.

Estas células casi siempre son incoloras y no dan suficiente contraste con el agua en el cual ellas están suspendidas, para ser visibles con claridad al microscopio. Al ser teñidas se incrementa el contraste con lo que le rodea, por lo tanto, son más visibles. Ciertas coloraciones pueden ayudar a identificar estructuras internas y el uso del objetivo de inmersión para su observación al microscopio es más conveniente para aumentar su magnificación.

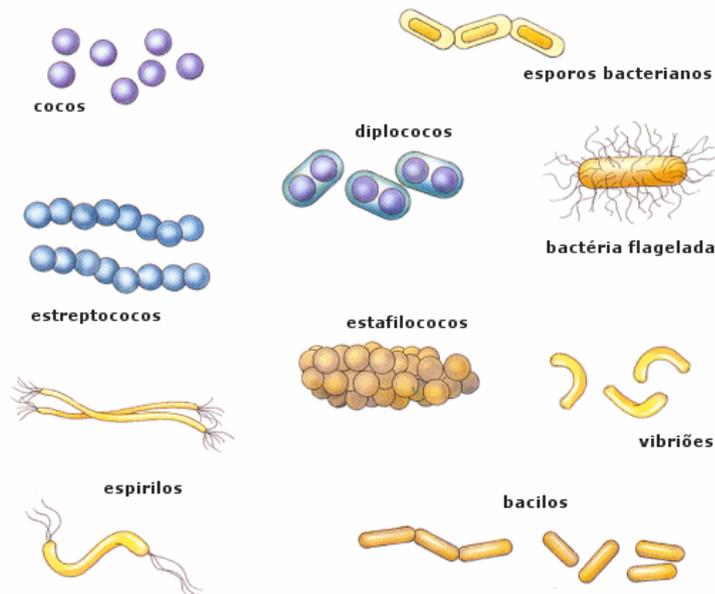


Figura 15. Clasificación de bacterias según su morfología.



Los colorantes usados en Microbiología son de tres tipos:

- A) Simples: cuando se utiliza un solo colorante como el Azul de metileno, Tinta China, Azul de Lactofenol.
- B) Diferenciales: cuando utilizan más de un colorante como la coloración de Gram y Ziehl - Neelsen.
- C) Especiales: cuando se usan colorantes que permiten reconocer ciertas estructuras celulares como la coloración de esporas, coloración de capsulas, etc.

3. Materiales:

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio compuesto		1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Láminas porta objetos		1
2	Láminas cubre objetos		1
3	Goteros		1
4	Letras en papel.		1
5	Papel lente		1
6	Puente de coloración		1
7	Palitos mondadientes		1
8	Asa de siembra		1

3.3. Reactivos.

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Aceite de cedro		1
2	Xilol		1
3	Azul de metileno		1
4	Azul de lactofenol		1
5	Set de coloración de GRAM		1
6	Tinta china		1



4. Procedimiento:

Preparación del frotis o extendido de la muestra

Muestra: sarro dentario,

Antes de colorear, se debe fijar el material a ser observado, si la preparación no está fijada a la lámina, las células se despegarán durante el proceso de coloración.

En este ejercicio el alumno utilizará el calor para matar las bacterias y producir así la adherencia al portaobjeto.

Utilizando un asa de siembra, colocar una asada de la muestra en estudio sobre los portaobjetos limpios (libres de grasa) previamente marcados con los códigos de las muestras.

Con el asa hacer el extendido, formando una capa fina sobre la lámina.

Colectar saliva en dos tubos estériles y proceder como en (1) y (2).

Dejar secar las láminas al aire o sujetarlas cerca de la llama del mechero.

Cuando el extendido está seco, con la muestra hacia arriba, pasar la lámina sobre el mechero, teniendo cuidado que mucho calor distorsiona la forma y las estructuras de las células bacterianas.

A. Coloraciones simples

Son aquellas coloraciones que utilizan un solo colorante para visualizar la morfología de los microorganismos.

Coloración azul de Metileno:

1. Preparar un frotis con la mezcla bacteriana y fijar al calor
2. Cubrir el frotis con una gota del colorante y dejar actuar por 3 – 5 minutos
3. Lavar con agua y dejar secar
4. Observar al microscopio con objetivo de inmersión y aceite de cedro

RESULTADO: Los microorganismos se observan de color azul intenso

Método de Burri (CON TINTA CHINA O NIGROSOINA)

1. Colocar una gota de tinta china sobre la lámina portaobjetos
2. Agregar una gota de la mezcla bacteriana
3. Cubrir la preparación con una laminilla cubre objeto
4. Observar con lente de menor y mayor aumento.

RESULTADO: Los microorganismos sin teñir resaltan sobre un fondo oscuro



Figura 16. *Cryptococcus neoformans* por el método de tinción con Tinta

Coloración azul de Lactofenol:

- 1 Colocar una gota del colorante sobre la lámina portaobjetos
- 2 Colocar una muestra de un cultivo de hongo sobre el colorante
- 3 Cubrir con una laminilla cubre objeto
- 4 Observar con lente de menor y mayor aumento

RESULTADO: Los microorganismos se observarán en un fondo azul – celeste

Cuestionario:

1. ¿Cuál es la función del ácido láctico en el azul de Lactofenol?
2. ¿Cuál es la importancia de utilizar los colorantes simples?

Procedimiento:

TINCIÓN GRAM

1. Preparar extendidos de la muestra en estudio y adicionalmente de cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
2. Fijar las preparaciones con calor en láminas por separado.
3. Colocar las láminas fijadas sobre el puente para colorear.
4. Cubre el frotis con cristal violeta durante 2 minutos.
5. Lavar la lámina con agua de caño o con la piceta cuidando de no eliminar la muestra, déjelo escurrir.
6. Cubrir la preparación con solución de Lugol para Gram durante un minuto.
7. Lavar la lámina con agua de caño o con la piceta, déjelo escurrir.
8. Decolorar con alcohol-acetona o con alcohol de 95% de 10 a 20 segundos, lave con agua de caño o con la piceta, déjelo escurrir.
9. Cubra el frotis con Safranina (colorante de contraste) de 20 a 30 segundos.
10. Lavar la lámina con agua de caño o con la piceta y escúrralo.



11. Secar las láminas con papel absorbente o dejar secar al aire libre.
12. Examinar las láminas al microscopio, con lente de inmersión (1000x).
13. Hacer esquemas de lo que observa al microscopio, en relación a la forma y coloración que han tomado las bacterias.

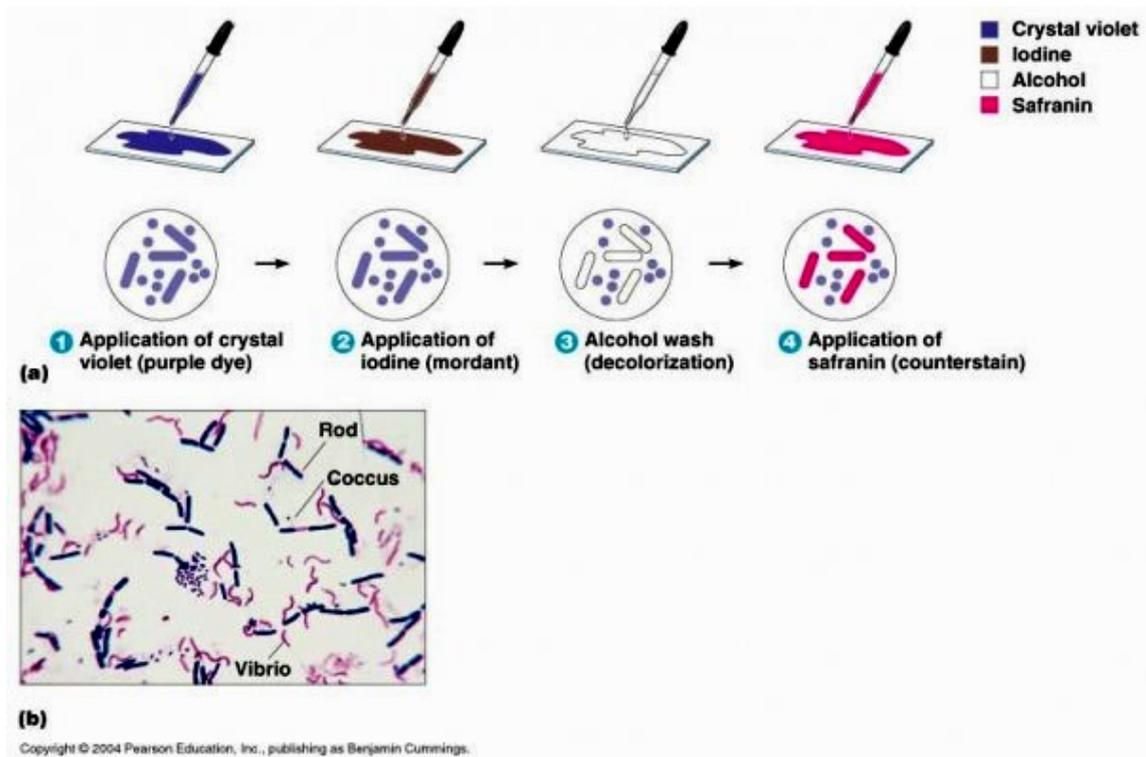


Figura 17. Esquemas de la Coloración de Gram.

Resultado:

Las bacterias Gram positivas se colorean de violeta y las bacterias Gram negativas de color rojo.

Cuestionario:

1. ¿Cuál es el colorante primario de la tinción Gram?
2. ¿Cuál es la función que cumple el Lugol en la coloración Gram?
3. Mencione 5 bacterias Gram positivas y 5 Gram negativas
4. Mencione otras técnicas de coloración empleadas en Microbiología.



PRÁCTICA # 6

Métodos de siembra

1. Objetivo:

- Realizar los diferentes métodos de siembra.
- Analizar la importancia de una siembra para el correcto aislamiento de la bacteria.

2. Generalidades:

El procedimiento por el cual se pone en contacto un microorganismo con un medio de cultivo, se llama siembra.

A) Métodos de siembra:

Siembra por estría: Diseminar en forma de zigzag, una pequeña cantidad de muestra bacteriana sobre la superficie del medio de cultivo sólido con la ayuda de un Asa de siembra en aro.

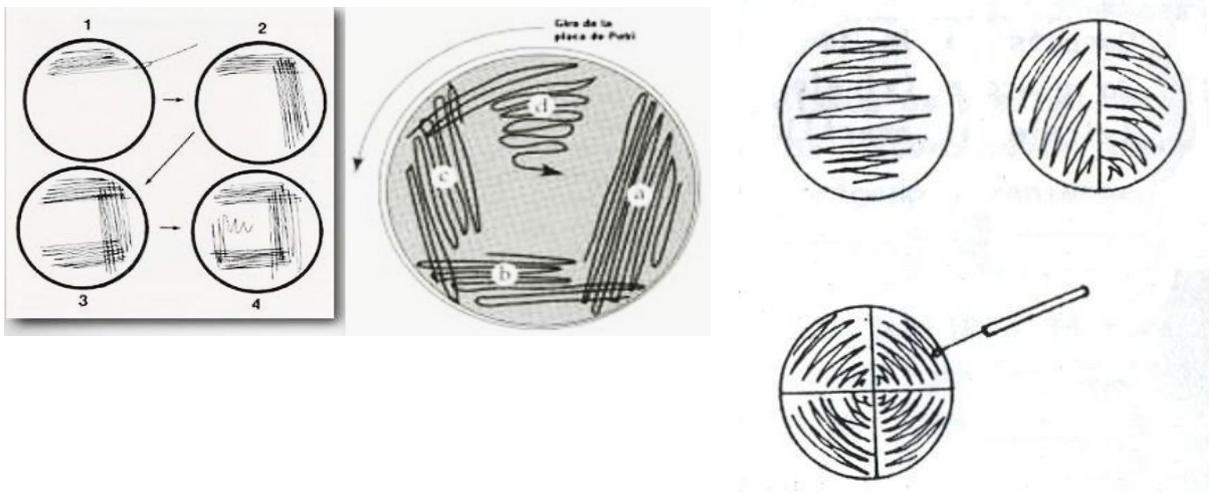


Figura 18. Método de siembra por estría.

Siembra por dispersión-agotamiento: Sembrar la muestra bacteriana en zigzag, hasta la mitad de la superficie del medio de cultivo sólido que se encuentra en una placa Petri, girar ésta unos 45° y continuar sembrando en zigzag, hasta que se agote toda la muestra del Asa de siembra en aro.

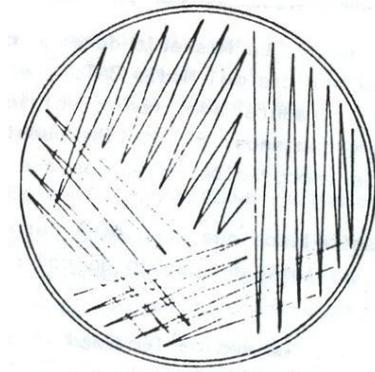
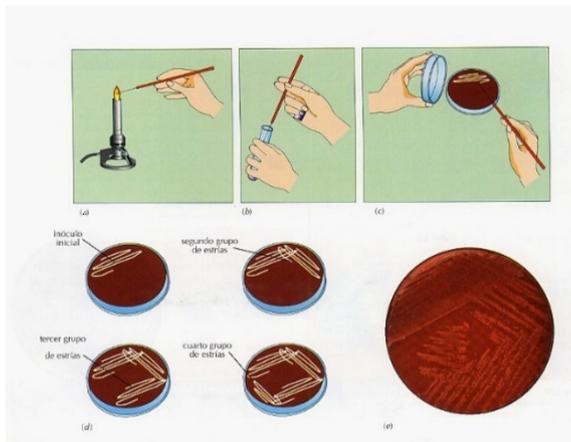


Figura 19. Método de siembra por agotamiento.

Siembra por puntura: Sembrar la muestra bacteriana en un tubo con Agar semisólido, con ayuda del Asa de siembra en punta, introduciéndola en forma vertical hasta la mitad de Agar.

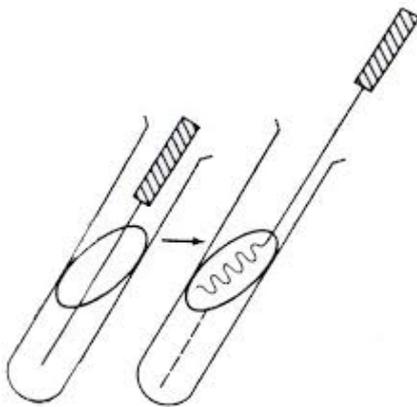


Figura 20. Método de siembra por puntura y estría en la superficie

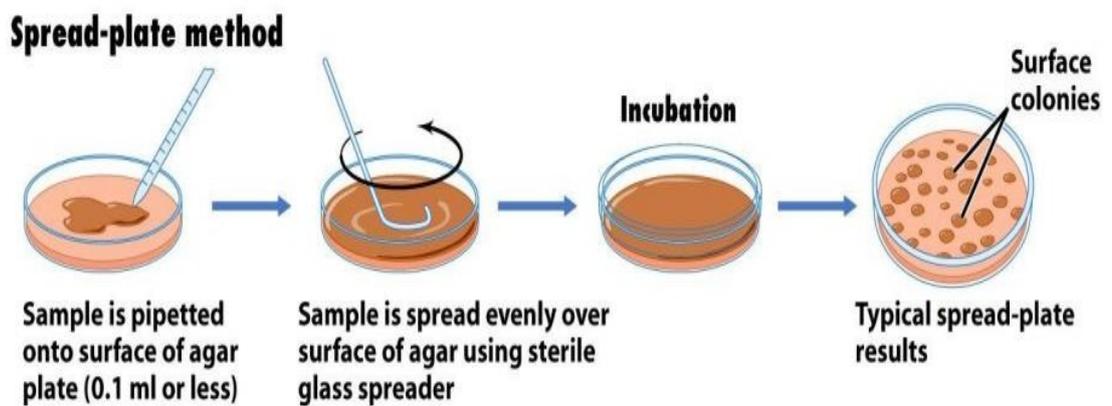


Figura 21. Método de siembra por Difusión.

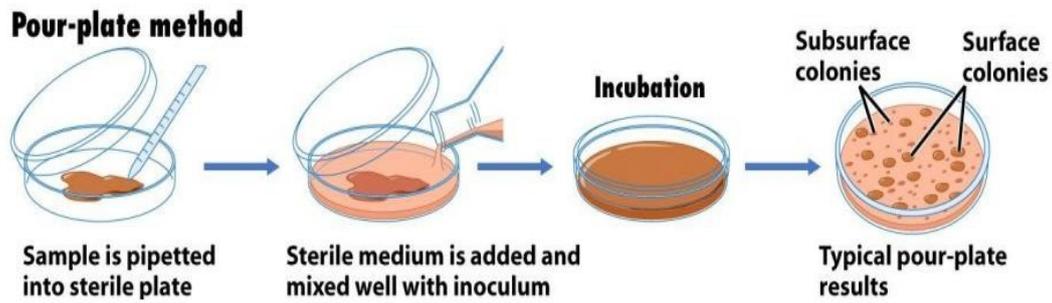


Figura 22. Método de siembra por Incorporación.

3. Materiales:

3.1. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Asa de siembra en aro y en punta		1
2	Mechero de bunsen		1
5	Encendedor		1

3.2. Reactivos.

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Aceite de cedro		1
2	Xilol		1

3.2 Medios de cultivo

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Agar nutritivo	Medio repartido Placa petri	1
2	Agar Mac Conkey	Medio repartido Placa petri	1
3	Agar SS.	Medio repartido Placa petri	1
4	Caldo Nutritivo	Tubo de ensayo	1

3.3 Cepas bacterianas

Item	Material	Característica	Cantidad
1	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	1



4. Procedimiento:

Muestra: CEPA BACTERIANA,

En esta técnica es muy importante emplear un asa de siembra en buen estado.

Siembra por agotamiento

- a) Esterilizar el asa flameándola en el mechero hasta conseguir un rojo incandescente.
- b) Enfriar el asa en la proximidad de la llama. Tomar un inóculo de la muestra.
- c) Transferir el inóculo a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde.
- d) Extender el inóculo formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa.
- e) Tomando como inóculo el obtenido mediante el rozamiento del asa de siembra con las estrías sembradas la primera vez, realizar sobre una porción virgen de la placa una segunda tanda de estrías que no toque la primera.
- f) Repetir exactamente la operación descrita en el punto anterior, pero empleando como inóculo la segunda tanda de estrías.
- g) Una vez terminada la siembra, dejar incubando a 37 °C por 24 horas y realizar la lectura de las colonias.



PRÁCTICA # 7

Lectura de colonias

1. Objetivo:

- Identificar las características fenotípicas de las colonias bacterianas.

2. Generalidades:

Cuando las bacterias se siembran en un medio de cultivo y en condiciones adecuadas, ocurre un incremento marcado del número de células.

Las placas de Petri y los tubos sembrados e incubados a 37°C por 18 a 24 horas, son retiradas de la incubadora para realizar la "lectura" de las colonias anotando sus características de crecimiento en los diferentes medios de cultivo.

Colonia: Es el desarrollo masivo de microorganismos de una especie. Es una agrupación de células bacterianas que comparten las mismas características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas cuando se hallan en un medio sólido o semisólido y se han originado de una sola célula progenitora. Las colonias elegidas para ser estudiadas deberán estar separadas una de otra y bien conservadas.

Estudio de las colonias en medio sólido

Las principales características morfológicas que presentan las colonias son:

- FORMA : Circular, elíptica, puntiforme y filamentosa e irregular.
- ELEVACIÓN : Plana, convexa, acuminada, umbilicada, papilar o crateriforme.
- BORDE : Entera, ondulada, dentada y filamentosos. festoneados.
- TAMAÑO : Se mide y expresa el diámetro de cada colonia en milímetros.
 - a) Grandes > de 4mm.
 - b) Medianos de 2 a 4mm.
 - c) Pequeños de 1 a < 2mm.
 - d) Puntiformes < 1mm
- CANTIDAD. - Hacer un recuento si es posible o dar una apreciación (poco, regular, abundante) de las colonias que son iguales.
- SUPERFICIE (ASPECTO) : Lisa, rugosa, granulada.
- CONSISTENCIA : Cremosa, membranosa y mucosa.
- CROMOGENESIS : Puede verse si la colonia es incolora o pigmentada; indicar el color y el medio de cultivo.
 - a) Incoloros: *Streptococcus*.
 - b) Pigmentos propios: *Pseudomonas aeruginosa* (bacilo pociánico, colonias verdes).
Bacteroides melaninogenicus (colonias de color negro).



- c) Pigmentos por el medio: *Escherichia coli* color rosado en agar MacConkey; *Salmonella* color negro en agar SS.

- OLOR.- Proteico, ácido láctico, a heces, a frutas (agradable o desagradable).
- CARACTERISTICAS DEBIDAS AL MEDIO DE CULTIVO:
 - a) La hemólisis en Agar Sangre:
 - Beta – hemolíticas : halo claro que indica hemólisis completa.
 - Alfa – hemolíticas : halo verdoso que indica hemólisis parcial.
 - Gamma – hemolíticas: ausencia de halo que indica no hemólisis.
 - b) Demostración de la acción enzimática sobre el sustrato del medio: Acción de proteasas, lipasas, DNAsas entre otras
 - c) Fermentación de carbohidratos.

Estudio de las colonias en medio líquido:

El desarrollo bacteriano en medio líquido se evidencia por la presencia de:

- Sedimento
- Turbidez
- Película

3. Materiales:

3.1. Equipos

Item	Equipos	Característica	Cantidad
1	Microscopio estereoscopio		1
2			

3.4 Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Regla		1
2	Lupa		1
3	Marcador de vidrio		1
4			



Procedimiento

Lectura :

Con la ayuda del profesor:

1. El alumno procederá a hacer el estudio de lo que ha desarrollado en los medios de cultivos sembrados.
2. Realizar un protocolo con los resultados obtenidos.

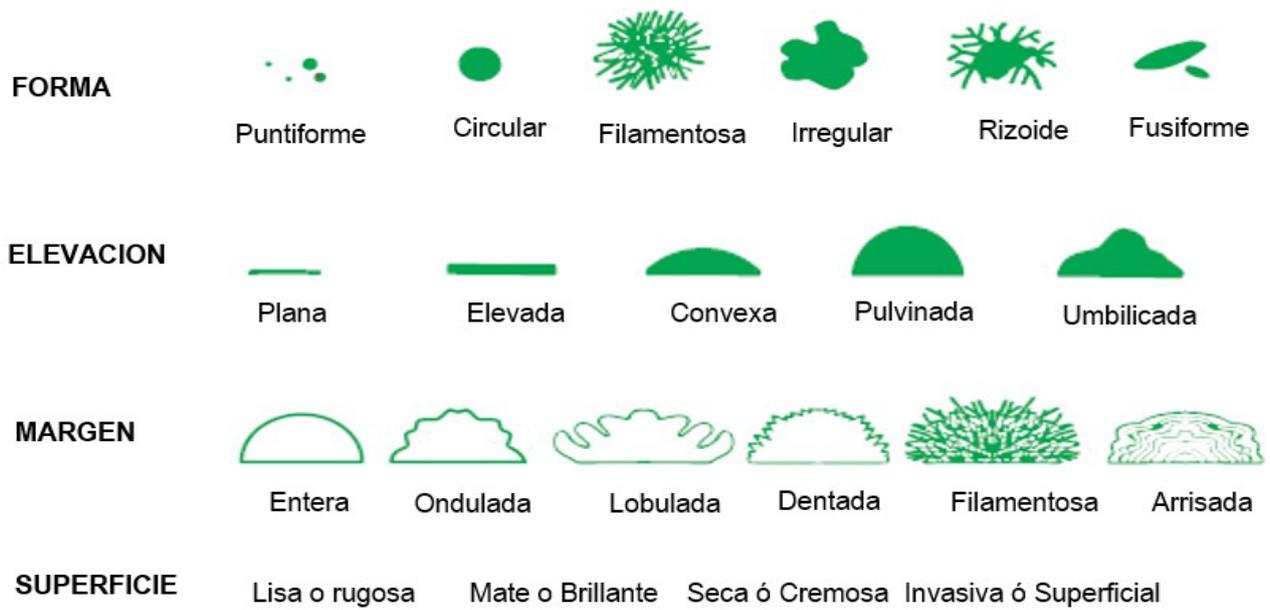


Figura 23. Morfología de las colonias bacterianas



PRÁCTICA # 8

Metabolismo microbiano

1. Objetivo:

- Identificar a los diferentes grupos bacterianos a través de su metabolismo.

2. Generalidades:

La identificación bacteriana inicial puede realizarse mediante la determinación de las características de las colonias y morfología con tinción de Gram u otras coloraciones. Sin embargo, la caracterización final de un aislamiento bacteriano desconocido, para identificarlo a nivel de género y especie se lleva a cabo estudiando ciertos sistemas enzimáticos que son únicos para cada especie y sirvan como marcadores de identificación. En el laboratorio, estos sistemas enzimáticos se detectan inoculando una pequeña porción de la colonia bacteriana aislada en una serie de medios de cultivo que contienen sustratos específicos e indicadores químicos que permiten detectar cambios del pH o la presencia de subproductos específicos.

A. AGAR TSI (Triple Sugar Iron)

EL medio TSI fue diseñado para la diferenciación de Bacilos Gram negativos, basándose en la capacidad potencial de estas bacterias para fermentar carbohidratos y producir sulfuro de hidrógeno (H₂S).

El medio contiene tres azúcares: **glucosa, lactosa y sacarosa** en proporciones de 1:10:10 respectivamente. Para detectar los productos ácidos generados se emplea un indicador de pH que es el **rojo de fenol** cuyo rango de viraje está entre pH 8.4 (rojo) y pH 6.8 (amarillo).

Los patrones de comportamiento de los bacilos Gram negativos ante los azúcares presentes en este medio pueden ser fundamentalmente tres:

1. Fermentación de glucosa únicamente.
2. Fermentación de glucosa + lactosa, glucosa + sacarosa o glucosa + ambos carbohidratos.
3. No fermentación de carbohidratos.

Como producto de la fermentación de los diferentes carbohidratos se puede formar **gas**, que se detecta como pequeñas burbujas o grietas en el medio o por desplazamiento del mismo hacia arriba del tubo. El medio tiene incorporado **tiosulfato de sodio** como fuente de azufre para generar **H₂S**, y sales de hierro que al reaccionar con el gas forman un precipitado negro insoluble de **sulfuro ferroso** (FeS).



Interpretación

Es indispensable que la lectura se haga en el tiempo de incubación indicada.

1. **Producto de H₂S:** ennegrecimiento en el fondo del tubo.
2. **Fermentación de la glucosa únicamente:** (rojo/amarillo), esto se debe a que la glucosa (que se encuentra en baja concentración con respecto a los otros azúcares), ha sido utilizada y la cantidad de ácido producido no es suficiente para neutralizar los productos alcalinos generados por la utilización de la peptona; además los ácidos pueden ser utilizados. Estos procesos, que son oxidativos, ocurren en la superficie del medio, mientras que, en el fondo, por no estar en contacto con el oxígeno, sólo hay fermentación y el medio permanece ácido.
3. **Fermentación doble o triple de carbohidratos:** (Amarillo/amarillo). La fermentación de la glucosa y alguno (o ambos) de los otros dos azúcares produce gran cantidad de ácidos, por lo que el tubo permanece amarillo.
4. **No fermentación de carbohidratos:** (rojo/anaranjado). Se presenta únicamente utilización oxidativa de peptonas, por lo que sólo la superficie del tubo se alcaliniza.
5. **Producción de gas:** Formación de burbujas (CO₂ e H⁺), grietas o desplazamiento del medio.



Figura 24. Agar TSI

B. MEDIO RM – VP (ROJO DE METILO – VOGES PROSKAUERetoina)

PRUEBA DEL ROJO DE METILO (RM)

La prueba de Rojo de metilo es una prueba cuantitativa que proporciona una característica valiosa para identificar especies bacterianas que **producen ácidos fuertes** (láctico, acético, fórmico) a partir de glucosa.

Estas bacterias que primariamente siguen la **vía de fermentación de ácidos mixtos** frecuentemente producen suficiente ácido después de una incubación prolongada, como para mantener un pH por debajo de **4.4** (el punto ácido límite del **indicador rojo de metilo**), superando el sistema amortiguador del pH del medio.



PRUEBA DE VOGES PROSKAUER (VP)

El ácido pirúvico, un compuesto fundamental formado en la degradación fermentativa de la glucosa, es metabolizado por algunos microorganismos produciendo el **acetil-metil- carbinol**(Acetoina)un **subproducto neutro de la vía 2,3- butilenglicol**.

La prueba se basa en la conversión del acetil- metil- carbinol en diacetil a través de la acción del **KOH** y Oxígeno atmosférico. El diacetilo es convertido en un complejo rojo bajo la acción catalítica del **Alfa naftol y Creatinina**.

Interpretación

1. Para la prueba **Rojo de Metilo**, añadir al cultivo unas gotas del reactivo del mismo nombre, cuyo rango de viraje está entre pH 4.4(rojo) y 6.0 (amarillo). La prueba **positiva** se manifiesta de color rojo estable y la **negativa** de color amarillo- naranja.
2. Para la prueba de **Voges- Proskauer**, agregar al cultivo 0.6 ml(12 gotas) de Alfa naftol y 0.2 ml (4 gotas) de KOH. Agitar el tubo por 1 minuto y dejarlo en reposo durante 15 minutos. Es importante añadir los reactivos en el orden específico.

Una **prueba positiva**, color rojo localizado en la mitad superior o en todo el tubo es observada dentro de los primeros 15 minutos. Si la lectura se realiza después de una hora los cultivos pueden presentar un color cobrizo, siendo esta una interpretación falsa positiva.

En la **prueba negativa** no cambia el color inicial del medio de cultivo.

C. MEDIO SIM (H₂S, INDOL Y MOTILIDAD)

PRODUCCION DEL INDOL

Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de actuar sobre el aminoácido **triptofano**, produciendo **indol**, un benzil pirrol, ácido pirúvico y amoniaco(NH₃). El indol puede detectarse en un medio rico en triptofano, observando la aparición de un color rojo(en forma de anillo o impregnado en la tira de papel), luego de agregar una solución que contiene **p- dimetilaminobenzaldehido**.

INTERPRETACION

La aparición de un color **rojo fucsia brillante** en la interfase del reactivo y el caldo, pocos segundos después de haber agregado el reactivo es indicativo de la presencia de indol y constituye una **prueba positiva**. Las bacterias que ha pesar de desarrollar en el medio, pero que no producen indol, al agregar el reactivo, este aparecerá sin cambio alguno, siendo esta una **prueba negativa**.

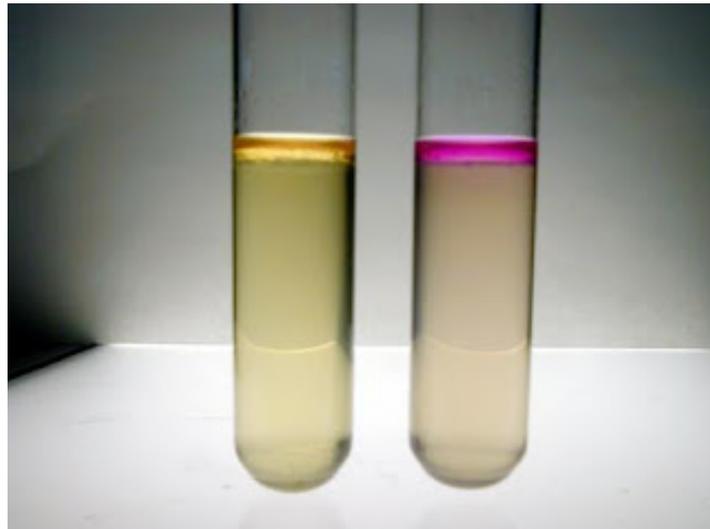


Figura 25. Medio SIM, se observa la producción de INDOL

D. UTILIZACION DEL CITRATO COMO UNICA FUENTE DE CARBONO

Esta prueba se utiliza principalmente para identificar varias especies de la familia **Enterobacteriaceae**, las cuales pueden obtener energía por vía distinta de la fermentación de los carbohidratos, utilizando el citrato de sodio como única fuente de carbono para su metabolismo y desarrollo, por lo tanto, cualquier medio que se emplee para determinar esta característica no debe contener proteínas ni carbohidratos. El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del **ciclo de Krebs**.

La utilización del citrato por una bacteria se detecta por su crecimiento en un medio con citrato con **formación** de **subproductos alcalinos**. El medio (Citrato de Simmons) incluye citrato de sodio, un anión como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de **amonio** (NH_3), alcalinizando el medio por conversión del NH_3 en **hidróxido de amonio** (NH_4OH), detectándolo con el indicador de pH incorporado el **azul de bromotimol** cuyo rango de viraje está entre pH 6.9 (verde) y pH 7.8 (azul).

Interpretación

1. **Prueba positiva:** Color azul en 24 a 48 horas y crecimiento en la superficie del medio inclinado.
2. **Prueba negativa:** No hay cambio de color ni crecimiento.

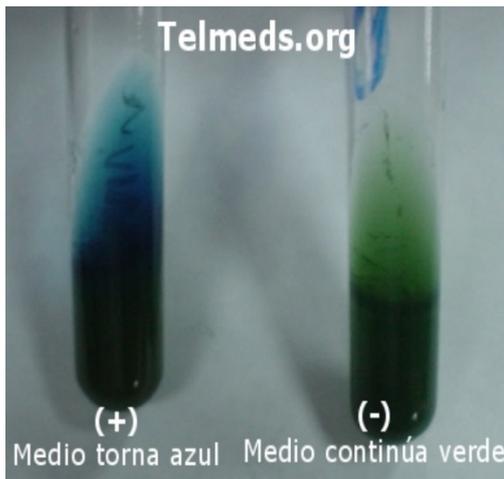


Fig. 26. Agar Citrato

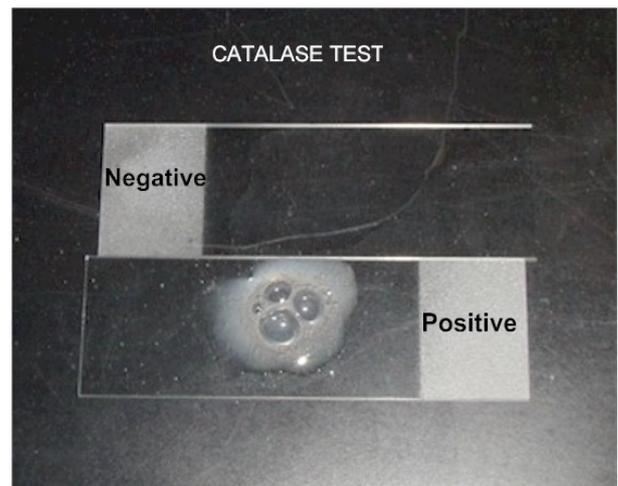


Figura 27. Prueba de catalasa

E. PRUEBA DE LA CATALASA

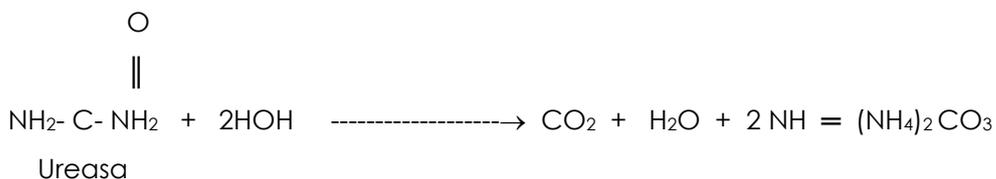
La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativa. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es uno de los productos finales del metabolismo oxidativo de los glúcidos y sí se acumula es letal para el microorganismo. La catalasa convierte el H₂O₂ en agua y oxígeno. La prueba es de importancia en la diferenciación de los estreptococos (catalasa negativa) de los estafilococos (catalasa positiva).

INTERPRETACION

Prueba cualitativa: La aparición rápida y prolongada de burbujas, de gas o efervescencia son indicativas de **catalasa positiva**.

F. HIDRÓLISIS DE LA UREA (PRUEBA DE LA UREASA)

Prueba importante para la identificación de especies bacterianas que poseen la enzima ureasa que hidroliza la urea, según el siguiente esquema:



El amoníaco reacciona en la solución para dar **carbonato de amonio, produciéndose** una **alcalinización** y un aumento del pH del medio que lleva como indicador el rojo neutro.

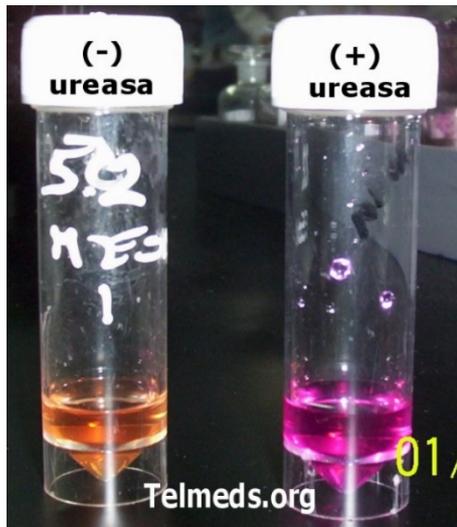


Figura 28. Medio Ureasa

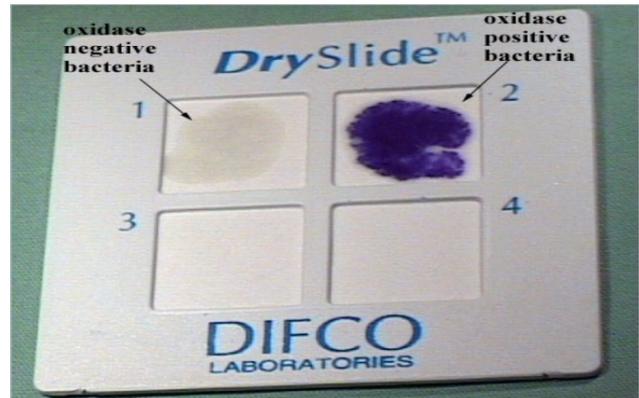


Figura 29. Prueba rápida de oxidasa

Interpretación

Prueba positiva: se observa de **color rosado** en la superficie o en todo el medio.

Prueba negativa: El medio permanece del color original

G. PRUEBA DE LA CITOCROMO – OXIDASA

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como el último eslabón de la cadena respiratoria aerobia, transfiriendo electrones (H) al oxígeno con formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, permitiendo identificar a organismos que carecen de la enzima o son anaerobios estrictos.

En el laboratorio se hace reaccionar la bacteria con un **sustrato oxidable** como el **dimetil o tetrametil- p- fenilendiamina** (el cual se presenta en solución, discos o tiras llamados comúnmente oxidasa).

Interpretación

Las colonias bacterianas con actividad Citocromo oxidasa desarrollan inmediatamente un intenso color azul oscuro.



3. Materiales:

3.1. Reactivos.

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Rojo de metilo		1
2	Alfa naftol al 5%		1
3	KOH al 40%)		1
4	Reactivo de oxidasa		1
5	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) al 3%		1
6	Reactivo de Kovac		1
7			

3.2. Medios de cultivo

Item	Medio de cultivo	Característica	Cantidad
1	Medio SIM		1
2	Agar TSI		1
3	Agar Citrato de Simmons		1
4	Medio Agar urea		1

3.3. Cepas bacterianas

Item	Material	Característica	Cantidad
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	1
3	<i>Proteus</i>		

4. Procedimiento

TSI.

- Con el asa de siembra inocule una porción pequeña de la colonia en el centro del tubo y estríe la superficie del pico de flauta.
- Rotular e incubar a 37°C por 18- 24 horas.

MR-VP.

- Por la técnica de inoculación, sembrar la cepa control, en el medio MR- VP. Rotular los tubos e incubar durante 48- 72 horas a 37°C.

CITRATO.

- Con el asa de siembra bien esterilizada, sembrar por la técnica de estría en cada tubo la cepa.
- Rotular los tubos e incubar a 37°C por 18- 24 horas.



UREASA.

- Por medio de la siembra por estría, sembrar la cepa bacteriana. No inocular en el fondo.
- Incubar durante 18- 24 horas a 37°C

PRUEBA EN LAMINA -catalasa.

- a) Con el asa bacteriológica en punta o un aplicador estéril, picar el centro de una colonia bien aislada y transferir él inculo a un portaobjetos limpio.
- b) Añadir 1 a 2 gotas de H₂O₂ al 3%
- c) Observar si se forman burbujas o no inmediatamente después que se añade el reactivo.
- d) Descartar la lámina en un recipiente con desinfectante.



Aislamiento de Rhizobium

1. Objetivo:

- Reconocer los nódulos de las raíces de las leguminosas que presentan Rhizobium
- Realizar una coloración GRAM a las bacterias aisladas de las nodulaciones de las raíces.

2. Generalidades:

RHIZOBIUM

Es bien conocido que un considerable número de especies bacterianas asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico en el crecimiento de plantas. Este grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) incluye el género *Rhizobium*. Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas.

La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. La estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas, de enzimas, de sideróforos y solubilización de fosfatos.

La asociación *Rhizobium-leguminosa* es la responsable de la mayoría del Nitrógeno atmosférico fijado. Las bacterias de este género, que en su forma libre tienen forma bacilar y están provistas de flagelos, infectan células meristemáticas de la raíz de leguminosas.

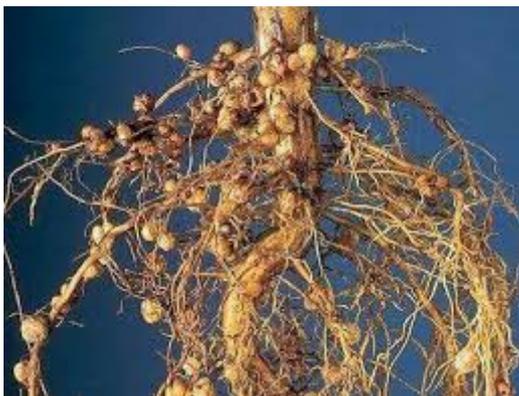


Figura 30. Raíz de leguminosas con tumoraciones

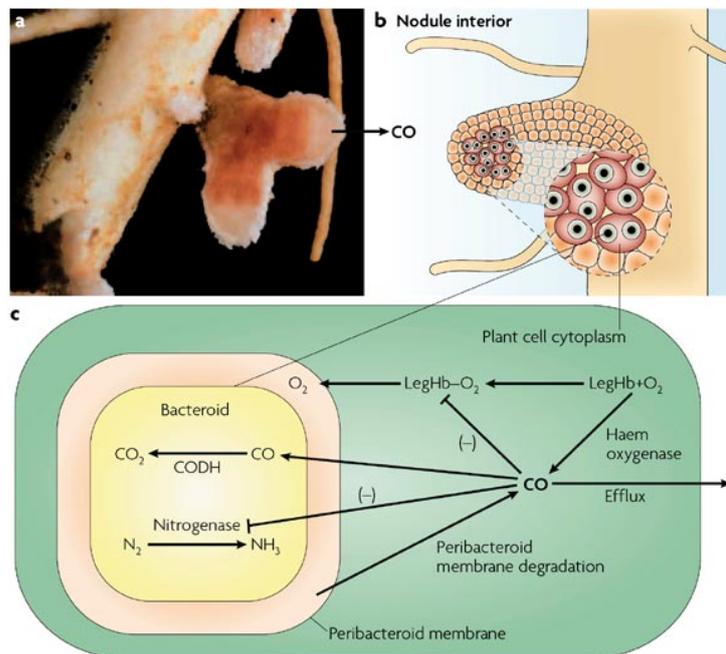


Figura 31. La Leg-hb está compuesta por un grupo hemo vinculada a un grupo prostético

La **leg-hemoglobina** es una hemoproteína presente en los nódulos radiculares fijadores de nitrógeno de las leguminosas. Las enzimas de este proceso de fijación son muy sensibles a la presencia de O_2 , por lo que la función de éste compuesto sería captarlo para evitar que produzca daños. Deja, sin embargo, O_2 libre suficiente para que tenga lugar la respiración celular.

3. Materiales:

3.1. Reactivos.

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Aceite de cedro		
2	Xilol		
3	Set de coloración de GRAM		
4			



3.2. Medios de cultivo

Item	Medio de cultivo	Característica	Cantidad
1	Agar Levadura- Manitol		
2			
3			
4			

Item	Material biológico	Característica	Cantidad
1	Raíces de leguminosas con nodulos		1
2			

4. Procedimiento:

- Recoger plantas de leguminosas en desarrollo (alfalfa, trébol...) preferentemente de suelos donde se hayan cultivado varias temporadas lo que garantizará la presencia de *Rhizobium*. Procure que el suelo esté lo suficientemente húmedo para extraer las raíces con el menor daño posible.
- Lave cuidadosamente las raíces recogidas y localice los nódulos presentes. 3.-Deposite uno de los nódulos sobre un portaobjetos con una gota de agua y, utilizando agujas enmangadas, desgarre su estructura para formar una extensión
- observable al microscopio.
- 4.-Cubra el material obtenido con Azul de metileno y, una vez seca la preparación,
- observe al microscopio y trate de identificar los bacteroides presentes.
- Posteriormente se siembra en medio Agar Levadura-Manitol.
- Realizar la lectura de las colonias entre 3 a 7 días.



Aislamiento de hongos

1. Objetivos:

- Identifica los distintos tipos de hongos que se pueden encontrar en muestra biológicas y determina su importancia ambiental

2. Generalidades:

Los hongos son organismos que se encuentran normalmente en diferentes hábitats (suelo, agua, aire o en sustancias orgánicas en descomposición), de acuerdo a sus exigencias nutricionales y ambientales muchos de ellos se adaptan a la vida parasitaria, causando enfermedades a las plantas, animales o al hombre.

Existen hongos que tienen un hábitat específico, a ellos se les puede clasificar como geofílicos, acuáticos, zoofílicos, fitofílicos o antropofílicos.

Hay diversidad de técnicas que permiten aislar diferentes especies de hongos a partir de variados substratos. En algunos casos es necesario utilizar medios especiales que faciliten el aislamiento y mantenimiento de dichos hongos.

2.1. Zygomycetes

Los zigomycetes acuáticos son hongos que normalmente viven en el agua y que se reproducen asexualmente por esporangiosporas. Varían de tamaño, desde unicelulares microscópicas hasta aquellos con micelio fácil de observar.

2.2. Ascomycetes

Como característica común presentan la formación de ascos, dentro de los cuales se lleva a cabo la fusión nuclear y posterior meiosis, seguido de un proceso mitótico. La estructura básica de los ascomicetos es una típica célula eucariota rodeada de una gruesa pared celular. Pueden estar constituidos por una célula (talo levaduriforme) o formar parte de largos filamentos tubulares denominados hifas (talo miceliar), los cuales están divididos en segmentos mediante septos (o tabiques) transversales.

Los individuos de la división Ascomycota son heterótrofos y obtienen los nutrientes esenciales a partir de otros organismos vivos (parásitos o biótrofos) o muertos (saprofitos). Como saprofitos (o saprobios) juegan un papel muy importante en el reciclaje de material vegetal en descomposición.



Como biótrofos, son capaces de formar simbiosis mutualistas con algas (dando lugar a la formación de líquenes), con raíces (micorrizas) o con hojas y/o tallos de plantas (endófitos o endobiontes). Otras asociaciones mutualistas se evidencian con artrópodos, tales como las termitas y hormigas.

2.3. Basidiomycetes

Constituyen aproximadamente el 30% de los hongos en general, semejan por sus exigencias nutricionales a los ascomycetos. Mayormente son especies saprófitas o parásitas de plantas y muy raramente de animales.

La mayoría no forman cuerpos fructíferos en cultivo, aunque muchos producen micelio; por consiguiente, es ...

3. Materiales:

3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Cocina eléctrica		1
2	Mallas de asbesto		1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mecheros bunsen		1
2	Asas bacteriológicas en anillo		1
3	Asas bacteriológicas con punta recta		1
4	Botellas con 100 ml de alcohol		1
5	Pizetas con agua destilada		1
7	Placas Petri estériles		1
8	Pinza de metal		1
9	Vaso de precipitación de 100 ml		1
10	Goteros de plástico		1
11	Espátulas Drigalsky		
12	Fruta con Moho		
13	Chicha de Jora		
14	Pan con Moho		1
	Agua de charco		



3.3. Medios de cultivo

Ítem	Material	Característica	Cantidad
12	Placas de Agar Papa Dextrosa PDA + Cloranfenicol		1
13	Placas con agar extracto de lavadura-malta más cloranfenicol (YM)		1
14	Placas con agar Sabouraud glucosado + Cloranfenicol		1
15	Placas con Agar Mac Conkey		1

4. Procedimiento:

4.1. Aislamiento de Zigomycetes

Aislamiento de Zigomycetes Acuáticos

Material biológico: agua de charco (de la zona estancada de arroyo) y **Canada:** moscas, cabellos, uñas

- Depositar aproximadamente 15 ml de agua de charco o acequia en una placa Petri estéril.
- Con ayuda de una pinza depositar 2 a 3 carnadas (moscas, cabellos, uñas), previamente cortadas en trozos pequeños y sometidos a una sumersión rápida en agua hirviendo, sobre la superficie del agua de charco.
- Dejar en incubación por 3 a 4 días, a temperatura ambiente.
- Para la observación microscópica recoger con ayuda del asa de siembra y pinzas, la carnada (moscas, cabellos, uñas, etc) que se encuentra recubierta por hifas y depositarlas sobre una gota de azul de Lactofenol en una lámina y cubrir con una laminilla.
- Para el aislamiento puede transferirse una carnada a un tubo con agar extracto de levadura-almidón. De lo contrario mantener la carnada en un frasco que contenga agua destilada estéril con carnadas iguales nuevas.
- Reportar los siguientes resultados:
 - a. Observación microscópica de las siguientes estructuras: esporangioforos, esporangios, esporangiosporas, hifas cenocíticas..
 - b. Observación macroscópica de las colonias fúngicas..

Aislamiento de Zigomicetos Terrestres. -

Material biológico: estiércol de vacuno.

- Depositar un pequeño trozo de estiércol, en cada extremo de una placa de agar papa dextrosa.
- Dejar en incubación por 3 a 4 días, a temperatura ambiente.
- Observación macromorfológica de las colonias fúngicas



- Observación microscópica de las colonias fúngicas. Con el asa de siembra en punta roma, recoger parte de la colonia y depositarla sobre una gota de azul de Lactofenol en una lámina y cubrir con una laminilla. Observar al Microscopio a 40x
- Estos hongos en su mayoría pueden ser aislados en cultivos puros, transfiriendo los micelios o esporangióforos a tubos con agar papa dextrosa.
- Reportar los siguientes resultados:
 - a. Observación microscópica de *Mucor* sp. y
 - b. Señalar las siguientes estructuras: esporangióforos, esporangios, esporangiosporas, hifas cenocíticas, columna.

4.2. Aislamiento de Ascomycetes

Levaduriformes

Material biológico: frutas maduras colocadas previamente en cámaras húmedas por varios días, jugos de fruta fermentados, sedimento de bebidas alcohólicas como chicha de jora.

- Se siembra la fruta madura (zona húmeda), jugo de fruta fermentado o bebida alcohólica en una placa de agar extracto de lavadura-malta (YM), por agotamiento.
- Se incuba a temperatura ambiente de 2 a 3 días.
- Se observa la formación de colonias elevadas, opacas, grandes y bien definidas.
- Con el asa de siembra en punta roma, recoger parte de la colonia y depositarla sobre una gota de azul de Lactofenol en una lámina y cubrir con una laminilla. Observar al Microscopio a 40x.
- Reportar los siguientes resultados:
- Observación microscópica de levaduras como *S. cerevisiae*:

4.3. Aislamiento de Basidiomycetes

Material biológico: planta con carbones (grass) o hongos macroscópicos, comestibles o de vida libre.

- Identificar los soros cerrados en plantas infectadas.
- Abrir el soro, con asa de siembra estéril, tomar una muestra de las esporas y sembrar en una placa con agar extracto de malta.
- Incubar a temperatura ambiente por 3 a 4 días.
- Observar el desarrollo de colonias y resembrar el micelio en tubos con agar extracto de malta.

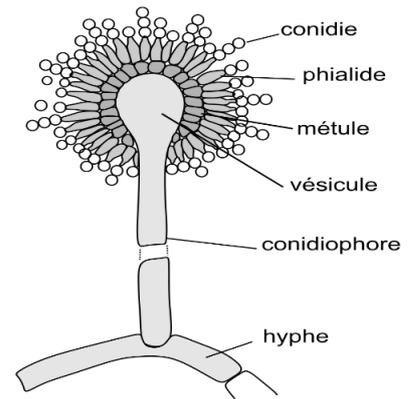


Figura 32. *Aspergillus*

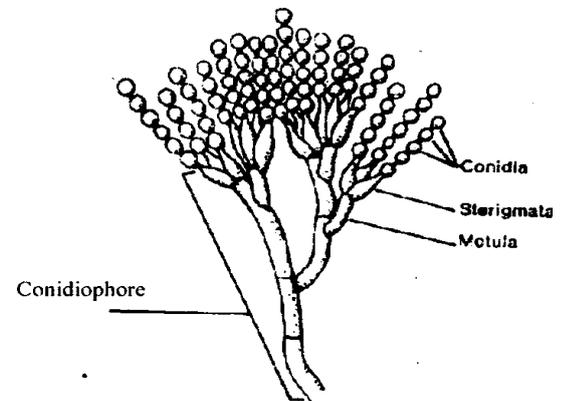
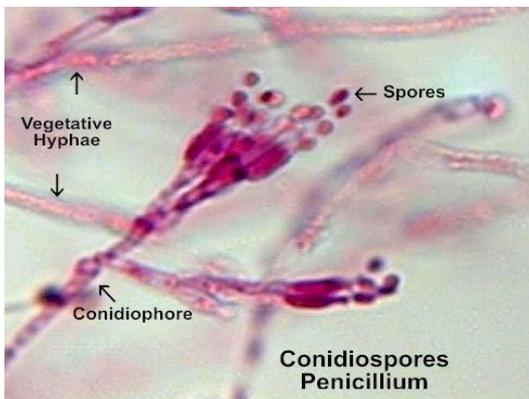
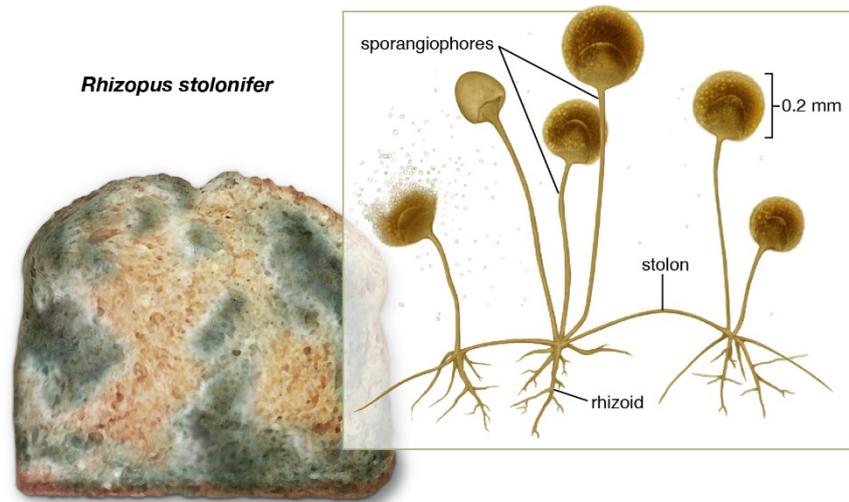


Figura 33. *Penicillium*

4.4. Coloración con Azul de Lactofenol:

- Con el lado adhesivo de la cinta, tocar la parte superior de hongo.
- Colocar suavemente la cinta sobre la gota de azul de algodón evitando la formación de burbujas para no alterar las estructuras. y poner otra gota de azul de lactofenol.
- Poner un cubreobjetos sobre la preparación.
- Dejar reposar durante 3-5 minutos y hacer observaciones en el microscopio con los objetivos de 10X y 40X.
- Observar con los objetivos de 10x y 40x. Localizar y observar hifas, estructuras especializadas como esporangióforos, esporangios, conidióforos, conidias y rizoides; determinar si las hifas presentan divisiones (septos)



© 2013 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figura 34. Moho del pan. *Rhizopus*



Técnicas para la enumeración de microorganismos:

Análisis microbiológico del agua

1. Objetivo:

- Identifica y analiza el método para identificar Coliformes en muestras de agua

2. Generalidades:

Debido a que un gran número de enfermedades son transmitidas por vía fecal-oral utilizando como vehículo los alimentos y el agua, es necesario contar con microorganismos que funcionen como indicador de contaminación fecal. Estos deben de ser constantes, abundantes y exclusivos de la materia fecal, deben tener una sobrevivencia similar a la de los patógenos intestinales y deben ser capaces de desarrollarse extra intestinalmente.

El grupo coliforme constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra, es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, su capacidad de sobrevivencia y multiplicación fuera del intestino también se observan en aguas potables, por lo que este grupo se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; encontrándose que mientras mayor sea el número de coliformes en agua, mayor será la probabilidad de estar frente a una contaminación reciente. Cuando los coliformes llegan a los alimentos, no sólo sobreviven, sino que se multiplican, por lo que en los alimentos el grupo coliforme adquiere un significado distinto al que recibe en el agua. Cuando los productos alimenticios han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción, etc.), estos microorganismos se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias. Para su estudio, se dividen en dos grupos. El grupo de bacterias **coliformes totales** el cual comprende a todos los bacilos Gram-negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*.



El grupo de **coliformes fecales**, está constituido por *bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h de incubación a $44.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$* . Este grupo incluye la especie *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo corto Gram negativo que se encuentra clasificado dentro de la familia Enterobacteriaceae (bacterias entéricas), existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, existen algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas.

La demostración y el recuento de organismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos con características selectivas y diferenciales.

FUNDAMENTO La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24-48 h., Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa.

En la fase presuntiva el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril Triptosa el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono.

Durante la fase confirmativa para determinar del número más probable (NMP) de Coliformes totales se emplea como medio de cultivo caldo lactosado bilis verde brillante (BRILLA) el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares en el medio BRILLA. La determinación del número más probable (NMP) de Coliformes fecales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de $44.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h en el medio EC.

Finalmente, la Fase Completa para la búsqueda de *Escherichia coli* se realiza a partir de los tubos positivos de caldo EC, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales como Agar Mac Conkey, Agar eosina azul de metileno (EMB) y posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas (IMViC) a las colonias típicas.



Técnica de tubos múltiples:

La prueba de tubos múltiples constituye un método estandarizado para la determinación de la densidad de bacterias indicadoras de contaminación. En esta prueba, réplicas de tubos de medios de cultivo específicos, son inoculados con diluciones decimales de una muestra dada de agua. La densidad bacteriana es calculada por medio de fórmulas de probabilidad que estiman el número más probable de bacterias para producir ciertas combinaciones de resultados positivos (como turbidez o formación de gas) y negativos.

Cuando se trata de agua no potable, se inoculan los tubos con cantidades decimales del agua. La selección de éstas va a depender de la densidad probable de coliformes y la experiencia del analista. Esta técnica puede también ser usada para sedimentos, haciendo una dilución de 10". Se pesan 50 gr de muestra (sólida o semisólida) y se adicionan 450 mL de agua de dilución y se agita por 1 ó 2 minutos.

Los resultados del análisis de los tubos de réplica y diluciones son reportados en términos de Número Más Probable (NMP).

El valor numérico de la estimación del contenido bacteriano es determinado por la dilución que mostró ambos resultados positivos y negativos.

La mejor evaluación de la calidad sanitaria del agua depende de la interpretación de resultados de la técnica de los tubos múltiples o de otros métodos, posiblemente más precisos y de toda la demás información relativa al agua que pueda ser obtenida por reconocimiento de la zona.

La mayoría de las tablas se basan en el uso de tres volúmenes diferentes de muestra en orden decimal decreciente (10, 1, 0.1, 0.01 mL etc.). Existen tablas para diferente número de réplicas de cada dilución. Las más comunes son de 5 y 3 réplicas por dilución respectivamente

Sólo si en los resultados aparecen tubos positivos y negativos cuando menos en una dilución, el número más probable proporciona un estimado significativo de la densidad bacteriana. La precisión de la estimación del NMP se incrementa al aumentar el número de réplicas por dilución.



3. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	Cocina eléctrica		1
2	Rejilla de asbesto		1
3	Incubadora		1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Micropipeta de 1000 ul		1
2	Tips para 1000 ul		1
3	Beacker de 1000 ml		1
4	Pipeta de vidrio esteril de 10 ml		1
5	Pipeta de vidrio esteril de 1 ml		1
7	Tubos de tapa rosca con campana Durham con 10 ml Lauril Sulfato doble concentrado		1
8	Tubos con tapa rosca con campana Durham con 10 ml Lauril Sulfato		1
9	Tubos con tapa rosca con campana Durham con 10 ml de BRILLA		1
10	Tubos con tapa rosca con campana Durham con 10 ml de EC		1
11	Placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)		1
12	Asas bacteriológicas (01 asa/mesa)		1
13	Botellas de alcohol de 70°		1
14	Pinza de metal		1
15	Gradillas para que ingresen tubos de tapa rosca		1
16	Botella con 90 ml de agua destilada estéril		1
17	Tubos de 13x 100 con 3 ml de agua destilada estéril		1



4. Procedimiento:

Muestra: Agua ó hielo

- **Prueba presuntiva: numeración de coliformes**

Agitar vigorosamente la muestra por lo menos 20 veces para lograr una distribución uniforme de los microorganismos. Dependiendo del origen de la muestra y el contenido bacteriano esperado preparar diluciones.

Agitar la muestra y transferir volúmenes de acuerdo con el cuadro 1, a cada uno de los tubos con caldo lauril sulfato de sodio que se hayan seleccionado. Agitar los tubos para homogeneizar la muestra.

CUADRO 1. Preparación de inóculo con caldo lauril sulfato de sodio

INOCULO (mL)	CANTIDAD DE MEDIO POR TUBO (mL)	VOLUMEN DE MEDIO MAS INOCULO (mL)	CALDO LAURIL TRIPTOSA REQUERIDO g/L	CONCENTRACIÓN
1	10 o más	11 o más	35,6	1 X
10	10	20	71,2	2 X
10	20	30	53,4	1.5 X
20	10	30	106,8	3 X
100	50	150	106,8	3 X
100	35	135	124.6	3.5 X
100	20	120	142.4	4 X

- Transferir 10, 1 y 0.1 ml de la muestra previamente homogeneizada a tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato triptosa, Utilizar 3 tubos por cada muestra de 10, 1 y 0.1.
- Incubar los tubos a 35-37°C durante 24 a 48 horas. Examinar los tubos a las 24 h., observar si hay formación de gas (desplazamiento del medio en la campana de Durham); si no se observa producción de gas, incubar 24 h. más.
- Escoger los tubos positivos (aquellos que presentan gas y turbidez y anotar el resultado). Calcular el **NMP para Coliformes/ 100 ml (Ver Tabla N°3)**

- **Prueba confirmatoria: numeración de coliformes totales**

- Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo de Caldo Lauril Triptosa obtenido durante la prueba presuntiva, a tubos que contiene 10 ml de caldo de bilis verde brillante (BRILLA), con campana de Durham.
- Agitar suavemente los tubos para su homogeneización.
- Incubar a 35 ± 2°C durante 24 a 48 h.
- Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe turbidez (crecimiento) y producción de gas después de un período de incubación de 24 a 48 h.
- Consultar la **Tabla 3** de NMP para conocer el número más probable NMP



Coliformes Totales/100mL.

- **Prueba confirmatoria: numeración de coliformes fecales**
 - Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo de Caldo Lauril Triptosa obtenido durante la prueba presuntiva a tubos con 10 ml de caldo EC.
 - Agitar suavemente los tubos para su homogeneización.
 - Incubar a 44.5 °C en incubadora o un baño de agua con circulación durante 24 a 48 h.
 - Seleccionar como positivos todos los tubos en donde se observe crecimiento y producción de gas después de un período de incubación de 24 a 48 h.
 - Consultar la **Tabla 3** para conocer el número más probable NMP coliformes fecales/ 100 mL.

- **Prueba confirmativa para *Escherichia coli***
 - Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y sembrar por estría cruzada en agar eosina azul de metileno (EMB) para su aislamiento.
 - Incubar las placas invertidas a 35°C por 18-24 h.
 - Seleccionar dos colonias de cada placa con la siguiente morfología colonial: Colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico. Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido *E. coli* de cada placa y sembrarlas en agar cuenta estándar para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas.
 - Incubar las placas a 35°C por 18-24 h.
 - Hacer un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram-negativos.

Cálculos y expresión de resultados

Calcular la densidad microbiana con base en el número más probable conforme al procedimiento señalado en la tabla 1, para estimar la población de bacterias coliformes totales, bacterias coliformes fecales y *Escherichia coli* en muestras de agua.

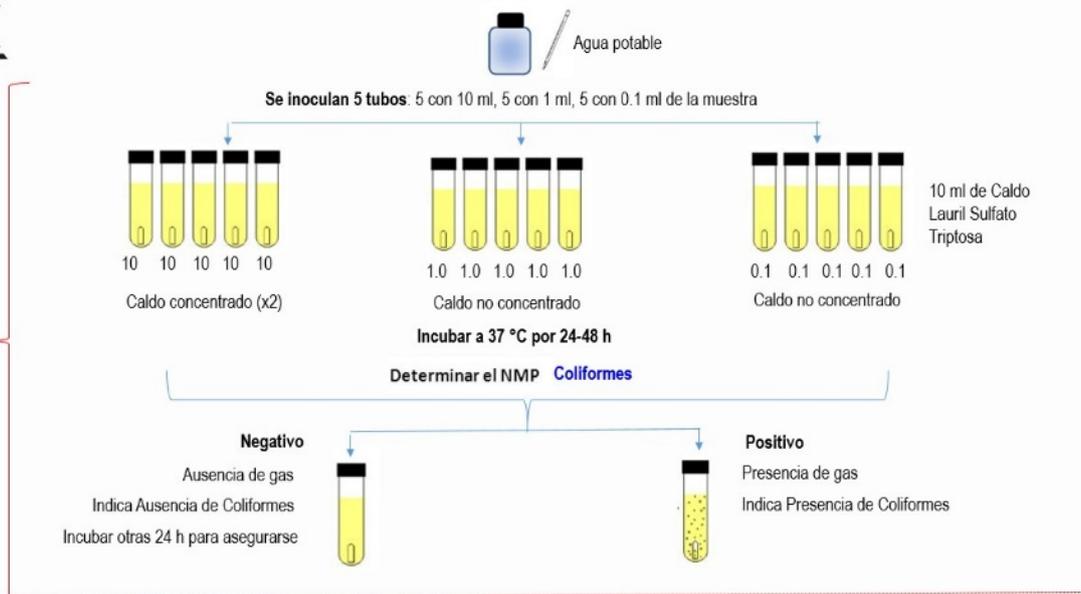
Determinación del número más probable (NMP)

Codificar los resultados de la serie de diluciones en los tubos de la siguiente manera: si inicialmente son inoculadas 5 porciones de 10 mL de muestra, 5 de 1 mL y 5 de 0.1 mL, y los resultados positivos fuesen respectivamente 5, 3 y 0, éstos se codificarán como 5-3-0. El código obtenido es buscado en la tabla del NMP (Tabla 2 y 3) y se registra directamente el NMP en 100 mL.



Prueba Presuntiva

NUMERACION DE COLIFORMES EN MUESTRAS DE AGUA



ucontinental.edu.pe

DILUCIONES SERIADAS



$$159 \times 10^3 \times 1 = 1,59 \times 10^5 \text{ UFC / ml de la muestra original}$$

$$\text{UFC / ml} = \text{Colonias contadas} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Volumen de inóculo}$$

Figura 35. Método de Diluciones



ANEXO 01

PREPARACION DE COLORANTES

I. TINCION SIMPLE

a) Safranina

Safranina.....	0.5 g
Agua destilada.....	100 mL

Preparación:

Disolver el colorante en el agua.

b) Cristal violeta

Cristal violeta.....	1 g
Agua destilada.....	100 mL

Preparación:

Disolver el colorante en el agua

c) Azul de metileno.

Azul de metileno.....	3 mL
Etanol de 96%.....	20 mL
Agua destilada.....	100 mL

Preparación:

Disolver el colorante en alcohol

Agregar el agua y filtrar

II. TINCION DE GRAM

a) Cristal violeta y oxalato de amonio. (Reactivo de Hucker)

Solución A:

Cristal violeta (pureza del colorante de por lo menos, el 90%).....	2 g
Etanol (95%).....	20 mL

Solución B:

Oxalato de amonio.....	0.8 g
Agua destilada.....	80 mL

Preparación

- Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo.
- Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice.
- Mezclar las dos soluciones y filtrar.



b) Solución de yodo yodurado. (Lugol)

Yodo (químicamente puro).....	1 g
Yoduro de potasio.....	2 g
Agua destilada.....	300 mL

Preparación:

- Combinar el yodo y el yoduro de potasio con la ayuda de un mortero.
- Lavar el contenido de éste con pequeñas alícuotas de agua destilada.
- Agregar agua suficiente para obtener un total de 300 mL.
- Agitar fuertemente.
- Almacenar la solución en una botella oscura y con tapón de vidrio.

c) Alcohol acetona

Alcohol etílico (95%).....	500 mL
Acetona.....	300 mL

Preparación:

- Mezclar los ingredientes respectivos de cada combinación para su uso.

d) Safranina

Safranina (pureza del colorante, 90%).....	0.25 g
Alcohol etílico (95%).....	10 mL
Agua destilada.....	1000 mL

Preparación:

- Disolver el colorante en el alcohol.
- Agregar el agua destilada.
- Filtrar y almacenar en frasco con tapón de vidrio.

III. TINCION DE ESPORAS (Método de Schaeffer y Fulton)

a) Verde de malaquita al 5%

Verde de malaquita.....	5 g
Agua destilada.....	100 mL

Preparación:

- Disolver el colorante en el agua y dejar en reposo durante una hora y media
- Filtrar y guardar en frasco oscuro

b) Safranina al 0.5%

Safranina.....	0.5 g
Agua destilada.....	100 mL

Preparación:

- Disolver el colorante y filtrar



IV. TINCION PARA FLAGELOS. (Método de Leifson)

Colorante de Leifson*

Sol. Saturada de $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ó $AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	20 mL
Disolución acuosa al 20% de Acido tánico.....	10 mL
Agua destilada.....	40 mL
Alcohol etílico al 95%.....	15 mL
Disolución saturada en alcohol etílico al 95% de fucsina básica.....	3 mL

Preparación:

- Mezclar los ingredientes en el orden citado
- Guardar en un frasco bien tapado

* Se encuentra en el comercio en forma de polvo

V. TINCION DE FLAGELOS (Alternativa)

Solución A:

Fucsina básica.....	1.2 g
Etanol (95%).....	100 mL

- Disolver el colorante
- Filtrar y tapar perfectamente para evitar la evaporación

Solución B:

Acido tánico.....	3 g
Agua destilada.....	100 mL

- Disolver el reactivo
- Si la mezcal no se usa pronto adicionar fenol al 0.2% para prevenir el desarrollo de hongos.

Solución C:

Cloruro de sodio.....	1.5 g
Agua destilada.....	100 mL

- Disolver el reactivo
- Esta solución es estable a temperatura ambiente

Preparación:

- Mezclar cantidades iguales de las soluciones A, B y C
- Guardar en frasco de vidrio y mantener bien tapado

NOTA:

La solución es estable por 5 semanas a temperatura ambiente y en refrigeración dura varios meses.

Colorante de contraste

p-rosa anilina o azul de metileno.....	1 g
Agua destilada.....	100 mL

Preparación:

- Disolver el colorante en el agua



VI. LACTOFENOL AZUL DE ALGODON

Agua destilada.....	20.0 mL
Cristales de fenol Q. P.....	20.0 g
Acido láctico.....	20.0 mL
Glicerina.....	20.0 mL
Azul de algodón.....	0.05 g

Preparación:

- Disolver el fenol en el agua
- Agregar el ácido y la glicerina
- Calentar a 70 °C
- Adicionar el colorante
- Guardar en frasco de vidrio



MEDIOS DE CULTIVOS

1. Agar Desoxicolato

Se emplea para el aislamiento de bacilos entéricos Gram-negativos. También se usa en el recuento de Coliformes en leche y productos lácteos.

Composición (g/l):

Sodio Desoxicolato	1,0
Hierro(III) Citrato	1,0
Lactosa	10,0
Peptonas	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Rojo Neutro	0,033
tri-Sodio Citrato	1,0
Cloruro de Sodio	5,0
Agar	16,0
pH: 7,3±0,2	

2. Agar DNasa

Se emplea para determinar la actividad de la desoxirribonucleasa producida por microorganismos, principalmente Estafilococos.

Composición (g/l):

Acido Desoxirribonucleico	2,0
Peptona de Caseína	15,0
Peptona de Soja	5,0
Sodio Cloruro	5,0
Agar	15,0
pH: 7,3±0,2	

3. Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

Se emplea como medio diferencial para el aislamiento y diferenciación de bacterias entéricas Gram-negativas.

Composición (g/l):

Eosina Amarillenta	0,4
Azul de Metileno	0,065
Lactosa	5,0
Peptona Bacteriológica	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Sacarosa	5,0
Agar	13,5
pH: 7,2±0,2	



4. Agar Hierro de Kligler

Se emplea en la diferenciación de bacilos entéricos Gram-negativos según la fermentación de dos azúcares (glucosa y lactosa) y la producción de Hidrógeno Sulfuro.

Composición (g/l):

Amonio Hierro(III) Citrato	0,5
D(+)-Glucosa	1,0
Lactosa	10,0
Mezcla de Peptonas	20,0
Rojo de Fenol	0,025
Sodio Cloruro	5,0
Sodio Tiosulfato	0,5
Agar	15,0
pH: 7,4±0,2	

5. Agar Hierro y Lisina

Se emplea como medio diferencial para Salmonella y Arizona, basado en la descarboxilación de la Lisina.

Composición (g/l):

Amonio Hierro(III) Citrato	0,5
L-Lisina	10,0
Extracto de Levadura	3,0
D(+)-Glucosa	1,0
Peptona de Gelatina	5,0
Púrpura de Bromocresol	0,02
Sodio Tiosulfato	0,04
Agar	13,5
pH: 6,7±0,2	

6. Agar Hierro y Triple Azúcar

Se emplea para identificar Enterobacteriáceas.

Composición (g/l):

Amonio Hierro(III) Citrato	0,3
D(+)-Glucosa	1,0
Extracto de Carne	3,0
Extracto de Levadura	3,0
Lactosa	10,0
Sacarosa	10,0
Mezcla de Peptonas (Carne/Caseína)	20,0
Rojo de Fenol	0,025



Sodio Cloruro	5,0
Sodio Tiosulfato	0,3
Agar	12,0
pH: 7,4±0,2	

7. Medio Transporte Cary-Blair.

Se emplea para favorecer y conservar la viabilidad de los microorganismos mientras son transportados al laboratorio.

Composición (g/l):

Calcio Cloruro	0,09
Sodio Cloruro	5,0
di-Sodio Hidrógeno Fosfato	1,1
Sodio Tioglicolato	1,5
Agar	5,5

pH: 8,4±0,2

8. Agar Mac Conkey.

Medio de cultivo utilizado en la investigación de organismos coliformes.

Composición (g/l):

Lactosa	10,0 g
Peptona (carne y caseína)	3,0 g
Sales Biliares	1,5 g
Peptona de Gelatina	17,0 g
Rojo Neutro	0,03 g
Sodio Cloruro	5,0 g
Violeta Cristal	0,001 g
Agar	13,5 g

pH final: 7,1±0,2

9. Agar Sal y Manitol.

Se emplea para el aislamiento selectivo y recuento de Estafilococos patógenos en productos lácteos, cárnicos, marinos y otros productos alimenticios.

Composición (g/l):

Sodio Cloruro	75,0
D(-)-Manita	10,0
Extracto de Carne	1,0
Digerido Pancreático de Caseína	5,0
Digerido Péptico de Tejido Animal	5,0
Rojo de Fenol	0,025
Agar	15,0



pH: 7,4±0,2

10. Medio MR-VP

Se emplea como medio diferencial para bacterias, principalmente Enterobacteriáceas, según la reacción del Rojo de Metilo y la de Voges-Proskauer.

Composición (g/l):

D(+)-Glucosa	5,0
Mezcla de Peptonas	7,0
tri-Potasio Fosfato	5,0
pH: 6,9±0,2	

11. Agar Mueller-Hinton

Se emplea para ensayos de sensibilidad de los microorganismos frente a antibióticos y sulfamidas. También en aislamiento primario de *Gonococos* y *Meningococos*.

Composición (g/l):

Almidón	1,5 g
Infusión de Carne	2,0 g
Peptona de Caseína Hidrolizada	17,5 g
Agar	17,0 g
pH: 7,4±0,2	

12. Agar Nutritivo

Medio recomendado para el cultivo de gran variedad de bacterias y para el recuento de organismos en aguas, heces y otros materiales.

Fórmula (por litro) del Agar

Extracto de Carne	3,0 g
Peptona de Gelatina	5,0 g
Agar	15,0 g
pH final: 6,8 ±0,2	

13. Caldo Nutritivo

Medio recomendado para el cultivo de gran variedad de bacterias y para el recuento de organismos en aguas, heces y otros materiales.

Fórmula (por litro) del Caldo

Extracto de Carne	3,0 g
Peptona de Gelatina	5,0 g
pH final: 6,8 ±0,2	



14. Agua de Peptona

Se emplea como diluyente en muestras alimentarias, aguas y materiales diversos. Para la realización de la prueba del Indol en aquellos microorganismos capaces de producirlo.

Composición (g/l):

Triptona	10 g
Sodio Cloruro	5 g
pH final:	7,2±0,2

15. Agar Glucosa Sabouraud.

Se utiliza para el cultivo de hongos y levaduras y para la numeración de estos microorganismos en alimentos y otros materiales. Los medios líquidos o caldos están indicados para pruebas de esterilidad; los agares Sabouraud con glucosa están especialmente indicados para dermatofitos, mientras que los que contienen maltosa favorecen el crecimiento de los hongos filamentosos. Se aconseja utilizar un medio suplementado con antibióticos cuando las muestras están altamente contaminadas.

Composición (g/l):

D(+)- Glucosa	40,0 g
Mezcla de Digerido Péptico de tejido animal y Digerido Pancreático de Caseína (1:1)	10,0 g
Agar	15,0 g
pH:	5,6 ± 0,2

16. Agar Salmonella y Shigella

Se emplea para el aislamiento de Salmonella y Shigella a partir de muestras de productos alimenticios u otros que pudieran contener estos gérmenes. Se trata de un medio altamente selectivo.

Composición (g/l):

Extracto de Carne	5,0
Hierro(III) Citrato	1,0
Lactosa	10,0
Peptonas	5,0
Rojo Neutro	0,025
Sales Biliares	8,5
tri-Sodio Citrato	8,5
Sodio Tiosulfato	8,5
Verde Brillante	0,00033
Agar	13,5
pH:	7,0±0,2



17. Agar Base Sangre

Se emplea, añadiendo sangre o sangre cocida, para el cultivo y aislamiento de microorganismos exigentes, sobre todo patógenos y para su determinación. Si no se añade sangre, es adecuado como base para la preparación de otros medios especiales.

Composición (g/l):

Infusión de Corazón	10,0 g
Peptona de Carne	10,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
pH final: 7,3±0,2	

18. Citrato de Simmons, Agar

Se emplea para la diferenciación e identificación de Enterobacteriáceas y ciertos Hongos, basándose en la utilización del Citrato.

Composición (g/l):

tri-Sodio Citrato	2,0
Amonio di-Hidrógeno Fosfato	1,0
Azul de Bromotimol	0,08
Magnesio Sulfato	0,2
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	1,0
Sodio Cloruro	5,0
Agar	15,0
pH: 6,9±0,2	

19. TCBS, Medio Cólera

Se emplea para el cultivo y aislamiento de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en productos marinos o muestras de diversos orígenes.

Composición (g/l):

Azul de Bromotimol	0,04
Azul de Timol	0,04
Bilis Desecada	8,0
Extracto de Levadura	5,0
Hierro(III) Citrato	1,0
Peptona de Carne	5,0
Peptona de Caseína	5,0
Sacarosa	20,0
tri-Sodio Citrato	10,0
Sodio Cloruro	10,0
Sodio Colato	3,0



Sodio Tiosulfato	10,0
Agar	14,0
pH: 8,6±0,2	

20. Agar Soja Triptona (TSA)

Se emplea como medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismos.

Fórmula (por litro)

Digerido Papaínico de Soja	5,0 g
Digerido Pancreático de Caseína	15,0 g
Sodio Cloruro	5,0 g
Agar	15,0 g
pH final: 7,3±0,2	

21. Caldo Soja Triptona (TSB).

Se emplea como medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismos.

Composición (g/l):

Digerido Papaínico de Soja	3,0
D(+)-Glucosa	2,5
Digerido Pancreático de Caseína	17,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,5
Sodio Cloruro	5,0
pH: 7,3 ±0,2	

22. XLD, Medio

Se emplea para el aislamiento de Enterobacteriáceas patógenas, principalmente Salmonella y Shigella, a partir de muestras biológicas y productos alimenticios.

Composición (g/l):

Amonio Hierro(III) Citrato	0,8
Extracto de Levadura	3,0
Lactosa	7,5
L-Lisina	5,0
Rojo de Fenol	0,08
Sacarosa	7,5
Sodio Cloruro	5,0
Sodio Desoxicolato	2,5
Sodio Tiosulfato	6,8
D(+)-Xilosa	3,5
Agar	13,5
pH: 7,4±0,2	



23. Agar Bilis Esculina.

Se emplea como medio diferencial para Enterococos y se recomienda para su aislamiento e identificación presuntiva.

Composición (g/l):

Bilis de Buey	40,0
Esculina	1,0
Extracto de Carne	3,0
Hierro(III) Citrato	0,5
Peptona Bacteriológica	5,0
Agar	15,0

pH: 6,6±0,2

24. OF, Medio Basal (Hugh Leifson, Medio)

Medio para la diferenciación de bacilos Gram-negativos, basados en la determinación del metabolismo oxidativo y/o fermentativo de los carbohidratos.

Composición (g/l):

Azul de Bromotimol	0,03
Peptona de Caseína	2,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	0,3
Sodio Cloruro	5,0
Agar	2,5

pH: 7,1±0,2

25. Agar Cromogénico *E.coli*

Medio selectivo para la determinación simultánea de *E.coli* y coliformes totales en aguas y muestras de alimentos.

Fórmula (por litro)

Composición (g/l):

Peptona Bacteriológica	3,0 g
Sodio Cloruro	5,0 g
Tampón fosfato	4,9 g
Sodio Piruvato	1,0 g
Triptófano	1,0 g
Sorbitol	1,0 g
Mezcla cromogénica	0,36 g
Tergitol-7	0,1 g
Agar	10,0 g

pH final: 6,8±0,2



26. E. coli 0157:H7, Base de Agar Cromogénico

Medio selectivo y diferencial para la detección de *E. coli* 0157:H7

Composición (g/l):

Mezcla de Peptona 20,0

Mezcla de cromogénicos 2,80

Agar Bacteriológico 15,0

pH: 7,2 ± 0,2



Colección de cepas de cultivos bacterianos

Abreviatura	Dirección
ATCC	American Type Culture Collection. 12301 Parklawn Drive. Rockville, Maryland 20852, EUA
CIP	Collection de bactéries de l'Institut Pasteur. Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F75724 Paris Cedex 15
DBDR	Division of Bacteriology and Dairy Research. Science Service. Ottawa, Canada
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Mascheroder Weg 1B D-38124 Braunschweig, RFA
ICPB	International Collection of Phytopathogenic Bacteria University of California. Davis Environmental Health & Safety Davis, CA 95616, USA
JCM	Japan Collection of Microorganism. Riken, Wako, Saitama 351-01, Japan
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria. 135 Abbey Road. Aberdeen, AB9 8DG, Escocia, Gran Bretaña
NCTC	National Collection of Type Cultures. Central Public Health Laboratory. Colindale Ave. London NW9 5HT, Gran Bretaña
NRRL	Northern Regional Research Laboratory. ARS Culture Collection.US Department of Agriculture. 1815 North University Street. Peoria, Illinois 61604, EUA



Anexo 02

Tablas de NMP para tres y cinco tubos

Tabla No 2. Números más probables por 100 ml. Usando cinco tubos de 10 ml, cinco tubos de 1 ml y cinco tubos de 0.1 ml.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 2		
0 - 0 - 1	2	< 0.5	7
0 - 1 - 0	2	< 0.5	7
0 - 2 - 0	4	< 0.5	11
1 - 0 - 0	2	< 0.5	7
1 - 0 - 1	4	< 0.5	11
1 - 1 - 0	4	< 0.5	11
1 - 1 - 1	6	< 0.5	15
1 - 2 - 0	6	< 0.5	15
2 - 0 - 0	5	< 0.5	13
2 - 0 - 1	7	1	17
2 - 1 - 0	7	1	17
2 - 1 - 1	9	2	21
2 - 2 - 0	9	2	21
2 - 3 - 0	12	3	28
3 - 0 - 0	8	1	19
3 - 0 - 1	11	2	25
3 - 1 - 0	11	2	25
3 - 1 - 1	14	4	34
3 - 2 - 0	14	4	34
3 - 2 - 1	17	5	46
3 - 3 - 0	17	5	46
4 - 0 - 0	13	3	31
4 - 0 - 1	17	5	46
4 - 1 - 0	17	5	46
4 - 1 - 1	21	7	63
4 - 1 - 2	26	9	78
4 - 2 - 0	22	7	67
4 - 2 - 1	26	9	78
4 - 3 - 0	27	9	80
4 - 3 - 1	33	11	93
4 - 4 - 0	34	12	93



Tabla No 2. Números más probables por 100 ml. Usando cinco tubos de 10 mL, cinco tubos de 1 mL y cinco tubos de 0.1 mL.
Continuación

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
5 - 0 - 0	23	7	70
5 - 0 - 1	31	11	89
5 - 0 - 2	43	15	110
5 - 1 - 0	33	11	93
5 - 1 - 1	46	16	120
5 - 1 - 2	63	21	150
5 - 2 - 0	49	17	130
5 - 2 - 1	70	23	170
5 - 2 - 2	94	28	220
5 - 3 - 0	79	25	190
5 - 3 - 1	110	31	250
5 - 3 - 2	140	37	340
5 - 3 - 3	180	44	500
5 - 4 - 0	130	35	300
5 - 4 - 1	170	43	490
5 - 4 - 2	220	57	700
5 - 4 - 3	280	90	850
5 - 4 - 4	350	120	1,000
5 - 5 - 0	240	68	750
5 - 5 - 1	350	120	1,000
5 - 5 - 2	540	180	1,400
5 - 5 - 3	920	300	3,200
5 - 5 - 4	1,600	640	5,800
5 - 5 - 5	≥ 2,400		



Tabla No 3. Número más probable por 100 mL. Usando tres tubos de 10 mL, tres tubos de 1 mL y tres tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 3		
0 - 0 - 1	3	< 0.5	9
0 - 1 - 0	3	< 0.5	13
1 - 0 - 0	4	< 0.5	20
1 - 0 - 1	7	1	21
1 - 1 - 0	7	1	23
1 - 1 - 1	11	3	36
2 - 0 - 0	9	1	36
2 - 0 - 1	14	3	37
2 - 1 - 0	15	3	44
2 - 1 - 1	20	7	89
2 - 2 - 0	21	4	47
2 - 2 - 1	28	10	150
3 - 0 - 0	23	4	120
3 - 0 - 1	39	7	130
3 - 0 - 2	64	15	380
3 - 1 - 0	43	7	210
3 - 1 - 1	75	14	230
3 - 1 - 2	120	30	380
3 - 2 - 0	93	15	380
3 - 2 - 1	150	30	440
3 - 2 - 2	210	35	470
3 - 3 - 0	240	36	1,300
3 - 3 - 1	460	71	2,400
3 - 3 - 2	1,100	150	4,800
3 - 3 - 3	≥ 2,400		



Referencias Bibliográficas

1. Atlas, R., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiológica ambiental*. 4ª ed. México D.
2. Lansing M. Prescott. (2004). *Microbiología*. (5ª ed.). McGraw Hill. código de Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004.
3. Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2009). *Biología de los microorganismos* (12ª ed.). España: Prentice Hall.
4. Atlas, R. y Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiológica ambiental* (4ª ed.). España: Pearson
5. Instituto Nacional de Salud (2019). Disponible en: www.ins.gob.pe/
6. Ministerio del Ambiente. [Accedido: 20/12/ 2019]. Disponible en: www.minan.org.pe
7. Sociedad Americana de Microbiología (ASM) Disponible en: <https://www.asm.org/>
8. Asociación Latinoamericana de Microbiología. Disponible en: <https://alam.science/>
9. Dirección general de Salud Ambiental. Disponible en: www.digesa.minsa.gob.pe/